

---

**Molekulare Mechanismen der FbaB-vermittelten Invasion von  
*Streptococcus pyogenes* in humane Endothelzellen**

\*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Silva Amelung  
aus Osterburg

1. Referentin oder Referent: Privatdozent. Dr. Manfred Rohde  
2. Referentin oder Referent: Professor Dr. Michael Steinert  
eingereicht am: 11.10.2010  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 21.12.2010

Druckjahr 2011

---

### **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

#### **Tagungsbeiträge**

**Amelung S., Nerlich A., Rohde M., Cole J.N., Nizet V., Chhatwal G.S., Talay S.R.:** FbaB protein of M3 group A streptococci is a Novel Endothelial Cell Invasin (Mai 2010). Posterpräsentation auf dem "110<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology". San Diego, CA, USA (finanziert durch den DAAD)

**Amelung S., Nerlich A., Rohde M., Fulde M., Nizet V., Chhatwal G.S., Talay S.R.:** FbaB Protein of group A streptococci mediates invasion into vasculature (März 2010). Vortrag auf der 3. Gemeinsame Tagung der DGHM e.V. und der VAAM

**Talay S. R., Amelung S., Nerlich A., Rohde M. and Chhatwal G.S.:** FbaB Protein of *Streptococcus pyogenes* is a novel vascular invasin (Juni 2008). Posterpräsentation auf dem "XVII Lancefield international symposium on streptococci and streptococcal diseases". Porto Heli, Griechenland

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i>	4
2.1.1 <i>Superfizielle Infektionen</i>	6
2.1.2 <i>Rheumatische Folgeerkrankungen</i>	6
2.1.3 <i>Invasive Erkrankungen</i>	7
2.2 <i>VIRULENZFAKTOREN VON S. PYOGENES</i>	9
2.2.1 <i>Adhärenz- und Invasionsfaktoren von S. pyogenes</i>	9
2.2.1.1 <i>Fibronektin-bindende Proteine von Gruppe A Streptokokken</i>	11
2.2.2 <i>Weitere Virulenzfaktoren</i>	12
2.3 <i>INVASIONSMECHANISMEN VON S. PYOGENES</i>	14
2.3.1 <i>Sfbl- und M1-vermittelte Invasionsmechanismen</i>	15
2.3.2 <i>Der Invasionsmechanismus von M3 S. pyogenes</i>	18
2.4 <i>FBAB</i>	21
2.5 <i>ZIEL DIESER ARBEIT</i>	24
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
3.1 <i>VERWENDETE MATERIALIEN</i>	25
3.1.1 <i>Chemikalien und Materialien</i>	25
3.1.2 <i>Oligonukleotide</i>	27
3.1.3 <i>Antikörper</i>	28
3.2 <i>VERWENDETE BAKTERIEN</i>	29
3.2.1 <i>Verwendete Bakterienstämme</i>	29
3.2.2 <i>Medien zur Kultivierung der Bakterien</i>	30
3.2.3 <i>Stammhaltung und Kultivierung</i>	30
3.3 <i>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</i>	31
3.3.1 <i>Isolierung chromosomaler- und Plasmid-DNA</i>	31
3.3.2 <i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	32
3.3.2.1 <i>Standard PCR</i>	32
3.3.2.2 <i>Kolonie PCR</i>	33
3.3.3 <i>Restriktion von DNA</i>	33
3.3.4 <i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	34
3.3.5 <i>Transformation von Bakterien</i>	34
3.3.5.1 <i>Transformation von E. coli</i>	34

3.3.5.2 Transformation von <i>S. agalactiae</i>	36
3.3.5.3 Transformation von <i>S. gordonii</i>	36
3.3.5.4 Transformation von <i>S. pyogenes</i>	37
3.3.6 Mutagenese von <i>S. pyogenes</i>	38
3.4 BIOCHEMISCHE METHODEN	40
3.4.1 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.4.2 Überexpression und Aufreinigung	40
3.4.2.1 Überexpression rekombinanter Proteine	40
3.4.2.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine	41
3.4.2.3 Aufreinigung polyklonaler Antikörper	42
3.4.3 Quantifizierung von Proteinen	43
3.4.4 Kopplung von Proteinen an Latexpartikel	43
3.4.5 Bindungsversuche	43
3.4.5.1 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™- Technik)	43
3.4.5.2 Bindungsversuche mit radioaktiv markierten Liganden	44
3.4.6 Nachweis der Oberflächenexpression von <i>FbaB</i>	45
3.4.6.1 Markierung von Oberflächen-gebundenem Protein auf Streptokokken	45
3.4.6.2 FACS (fluorescence activated cell sorting)	45
3.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	46
3.5.1 Verwendete Zellen	46
3.5.2 Kultivierung und Subkultivierung von HUVEC	47
3.5.3 Transfektion von HUVEC	47
3.5.4 Prä-Inkubation von HUVEC	48
3.5.4.1 Behandlung von HUVEC mit Inhibitoren	48
3.5.4.2 BSA-Gold Behandlung von HUVEC	48
3.5.5 Infektionsversuche	49
3.6 MIKROSKOPISCHE ARBEITEN	50
3.6.1 Elektronenmikroskopie	50
3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie	51
3.6.2.1 Konfokale Mikroskopie	51
3.6.2.2 Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen	52
3.6.2.2.1 Differentielle Fluoreszenzfärbung von Streptokokken und Latexpartikel	52
3.6.2.2.2 Fluoreszenzfärbung von Streptokokken und Zellkomponenten	53
3.6.2.3 Statistische Auswertung	54
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
4.1 KONSTRUKTION EINES BAKTERIELLEN SYSTEMS ZUR HETEROLOGEN EXPRESSION VON FBAB UND EINER <i>FBAB KNOCK OUT</i>	
MUTANTE	55
4.1.1 Konstruktion eines bakteriellen Systems zur heterologen Expression von <i>FbaB</i>	55
4.1.2 Generierung einer <i>fbaB knock out</i> Mutante	57

4.2 FBAB BINDET AN PROTEINE DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX	58
4.2.1 <i>FbaB bindet über fibronectin-binding repeats an das 30 kDa Fragment des Fibronektins</i>	59
4.3 FBAB IST EIN POTENTES INVASIN AUF ENDOTHELZELLEN	60
4.3.1 <i>FbaB vermittelt Invasion in Endothelzellen</i>	60
4.3.2 <i>Die FbaB vermittelte Aufnahme erfolgt über Fibronektin</i>	62
4.4 FBAB VERMITTELT F-AKTIN ABHÄNGIGE AUFNAHME ÜBER DEN ZIPPER MECHANISMUS	64
4.4.1 <i>Bildung von Membranausstülpungen und Aufnahme über zipper-Mechanismus</i>	64
4.4.2 <i>F-Aktin Akkumulation</i>	65
4.5. FBAB VERMITTELT DEN KLASSISCHEN ENDOCYTISCHEN WEG	67
4.5.1 <i>FbaB vermittelt die Aufnahme in frühe Endosomen</i>	67
4.5.2 <i>FbaB vermittelt die Aufnahme in Lysosomen</i>	69
4.6 ROLLE VON RAC1 BEI DER FBAB VERMITTELTEN AUFNAHME	72
4.6.1 <i>FbaB vermittelte Aufnahme führt zur Aktivierung und Akkumulation von Rac1 am Invasionsort</i>	72
4.6.2 <i>Rac1 ist essentiell für die Internalisierung</i>	74
4.7 UNTERSUCHUNG DER INTRAZELLULÄREN SIGNALWEGE BEI DER FBAB VERMITTELTEN INVASION	76
4.7.1 <i>Phospholipase C ist an der FbaB-vermittelten Aufnahme beteiligt</i>	76
4.7.2 <i>Rolle der PI3-Kinase und der Src-Kinase bei der FbaB-vermittelten Aufnahme</i>	78
4.7.3 <i>Intrazelluläres Calcium ist notwendig für eine erfolgreiche Aufnahme</i>	79
4.7.4 <i>Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) bei der FbaB-vermittelten Aufnahme</i>	80
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>83</b>
<b>6. LITERATUR.....</b>	<b>98</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>108</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

2.1	Verteilung schwerer GAS-Infektionen in Europa von 2003-2004.....	4
2.2	Morphologie von Gruppe A Streptokokken.....	5
2.3	Klinischer Verlauf der Nekrotisierenden Faszitis.....	8
2.4	Schema der Adhärenz von GAS an Rachnepithelzellen.....	10
2.5	Schema über die Virulenzfaktoren von GAS, welche an der Umgehung der Immunantwort beteiligt sind.....	13
2.6	Pathogen-induzierte Invasionsmechanismen über Membranausstülpungen.....	14
2.7	Schematische Darstellung der SfbI- und M1-vermittelten intrazellulären Vorgänge bei der Aufnahme von GAS.....	17
2.8	Vergleich des M1- und SfbI-vermittelten endozytischen Weges.....	18
2.9	Schematische Darstellung der intrazellulären Vorgänge während der Aufnahme von M3 GAS in Endothelzellen.....	19
2.10	Gegenüberstellung des <i>fbaB</i> - und <i>pfbp</i> -Gens.....	21
2.11	Schematisches Modell der FCT-3 Region von M3 <i>S. pyogenes</i> .....	22
2.12	Modell über den strukturellen Aufbau von FbaB.....	23
3.1	Modell: Mutagenese von M3 <i>S. pyogenes</i> A60 zur Konstruktion einer <i>fbaB-knockout</i> Mutante.....	39
3.2	Prinzip der BIAcore™-Technik.....	44
4.1	Heterologe Expression von FbaB auf der Oberfläche von <i>Streptococcus agalactiae</i> ..	56
4.2	Expression von FbaB auf der Oberfläche von <i>S. gordonii</i> .....	56
4.3	Untersuchung von A60Δ <i>fbaB</i> hinsichtlich der Expression von FbaB.....	57
4.4	Bindung von FbaB an das 30 kDa Fibronektin Fragment .....	59
4.5	Darstellung des von FbaB-vermittelten Invasionspotential auf humanen Endothelzellen.....	61
4.6	Quantifizierung des FbaB-vermittelten Invasionspotentials in humane Endothelzellen.....	62
4.7	Fibronektin-abhängigkeit bei der FbaB-vermittelten Invasion in HUVEC.....	63
4.8	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der von FbaB vermittelten Internalisierung in HUVEC.....	65
4.9	Akkumulation von F-Aktin.....	66
4.10	Kolokalisation von FbaB tragenden <i>beads</i> und Bakterien mit frühen Endosomen.....	68
4.11	Kolokalisation von FbaB tragenden <i>beads</i> und Bakterien mit frühen Endosomen.....	69
4.12	Lysosomale Lokalisation von internalisierten Bakterien und <i>beads</i> .....	70
4.13	Elektronenmikroskopische Schnitte von FbaB-exprimierenden Bakterien in HUVEC.....	71

4.14	Rac1 Akkumulation in der Nähe von zellassozierten Bakterien.....	73
4.15	Aktivierung von Rac1 während der Internalisierung von GBS FbaB in HUVEC.....	74
4.16	Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB in Rac1-WT und Rac1-N17 exprimierende Zellen.....	75
4.17	Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB bei Inhibition der PLC.....	77
4.18	Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB nach der Inhibierung von PI3- und Src-Kinase.....	78
4.19	Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB in Abhängigkeit von $Ca^{2+}$ .....	80
4.20	Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB in Abhängigkeit der PKC.....	81
5.1	Vergleich der FbaB- und SfbI-vermittelten Invasionswege.....	89
5.2	Darstellung der Vorgänge an der Plasmamembran während der Phagozytose.....	95
5.3	Übersicht über die zellulären Vorgänge, wie sie während der FbaB-vermittelten Aufnahme vermutet werden.....	96



# TABELLENVERZEICHNIS

3.1	Verwendete Oligonukleotide .....	27
3.2	Verwendete Antikörper.....	28
3.3	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	29
3.4	Verwendete Streptokokken Stämme.....	29
3.5	Selektionsbedingungen verwendeter Stämme .....	31
3.6	Verwendete Inhibitoren für zelluläre Komponenten.....	48

# 1. Zusammenfassung

*Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*, GAS) verursacht neben leichten superfiziellen Infektionen der Haut und Schleimhaut auch schwere invasive Erkrankungen, wie das *streptococcal toxic shock syndrome* (STSS) oder die Nekrotisierende Faszitis (NF). Der M3 Serotyp von *S. pyogenes* steht oft in Verbindung mit diesen Infektionen des Weichgewebes, bei denen die Bakterien verschiedene Wirtsbarrieren überwinden müssen. Eine dieser Barrieren stellt das Endothel dar, welches das Lumen der Blutgefäße auskleidet. Invasine sind wichtige bakterielle Virulenzfaktoren, die das Eindringen in humane Zellen ermöglichen. Jüngste Arbeiten zeigten, dass *S. pyogenes* vom Serotyp M3 in Endothelzellen invadieren kann. Der invasionsvermittelnde Faktor jedoch blieb bis zum Beginn dieser Arbeit unentdeckt. Da dieser Serotyp ein im Zusammenhang mit STSS stehendes Fibronektin-bindendes Protein – FbaB – exprimiert, war das Ziel dieser Arbeit, die Rolle von FbaB im Invasionsprozess von M3 *S. pyogenes* in Bezug auf Endothelzellen zu untersuchen.

Zum einen wurden heterolog exprimierende Bakterienstämme generiert, die das vollständige FbaB Protein auf der Oberfläche tragen. Zum anderen wurde eine *knock-out* Mutante in M3 *S. pyogenes* konstruiert, bei der das *fbaB* Gen deletiert wurde. Neben diesen Werkzeugen dienten FbaB-gekoppelte Latexpartikel als Modellsystem zur Untersuchung des Invasionspotentials von FbaB in *in vitro* Infektionsversuchen mit primären humanen Endothelzellen. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass FbaB ein schnelles und potentes Invasin von M3 GAS für Endothelzellen ist. Weitere Untersuchungen ergaben einen *zipper*-basierten, Phagozytose-ähnlichen Aufnahmemechanismus, dem eine massive Reorganisation des F-Aktin Zytoskeletts zugrunde liegt. Der kleinen GTPase Rac1 konnte eine essentielle Rolle bei der FbaB-vermittelten F-Aktin Reorganisation und damit beim Aufnahmeprozess zugewiesen werden. Im weiteren Verlauf führte der von FbaB eingeleitete Invasionsprozess zur Aufnahme in frühe Endosomen, die zu späten Endosomen reifen und letztlich mit terminalen Lysosomen fusionieren. Analysen der intrazellulären Signalwege ergaben eine Beteiligung der Phospholipase C, des intrazellulären Calciums und der Proteinkinase C. Ferner zeigt diese Arbeit, dass bei der FbaB-vermittelten Aufnahme auch eine Beteiligung der PI3-Kinasen und der Src-Kinase nicht ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FbaB das erste identifizierte Endothelzellinvasin von *S. pyogenes* ist. Wie auch im Falle von M3 *S. pyogenes*, gleicht der FbaB-vermittelte Aufnahmeprozess einer klassischen Phagozytose: Aufnahme über den *zipper* Mechanismus, F-Aktin-Akkumulation am Eintrittsort, und Einleiten des klassischen endozytischen Weges

mit lysosomaler Bestimmung sind die Schlüsselcharakteristika der FbaB/M3 *S. pyogenes* induzierten Endothelinvasion.

## Summary

*Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*, GAS) is related to severe invasive disease such as streptococcal toxic shock syndrome (STSS) or necrotizing fasciitis (NF). These are accompanied by serious tissue damage and often associated with the M3 serotype of *S. pyogenes*. To cause tissue invasion and subsequent damage bacteria have to overcome distinct host barriers, one of which is the endothelial cell lining. Invasins are important virulence factors for gaining access into host cells. It was recently demonstrated that M3 GAS strongly invade primary human endothelial cells. The invasion-mediating factor, however, remained unidentified. Since M3 *S. pyogenes* express FbaB, a fibronectin-binding protein associated with STSS, FbaB represented an interesting candidate for mediating invasion into endothelial cells.

The aim of this study was therefore to uncover the invasion potential of FbaB on endothelial cells *in vitro*. First, a *Streptococcus agalactiae* (GBS) strain expressing full length FbaB on the surface was constructed. Second, a *S. pyogenes* knock-out mutant lacking the *fbaB* gene was generated. These tools together with FbaB protein-coated latex beads were used to examine the role of FbaB in a primary human endothelial cell infection assay. Uptake kinetics were determined for FbaB expressing bacteria as well as for FbaB coated beads using immunofluorescence and electron microscopy. Both, FbaB-coated latex beads as well as the FbaB expressing GBS strain were efficiently and rapidly internalized into endothelial cells. Further analyses of the trafficking route revealed a membrane protrusion-mediated uptake mechanism which involves massive F-actin accumulation resulting from Rac-1 recruitment and activation. Furthermore, it could be shown that FbaB mediates uptake into early endosomes, which subsequently mature and fuse with lysosomes. Chemical interference with cellular signaling molecules revealed involvement of the phospholipase C (PLC), intracellular calcium and protein kinase C (PKC). This study also revealed a potential involvement of PI3 kinases and Src kinase in the FbaB mediated uptake process.

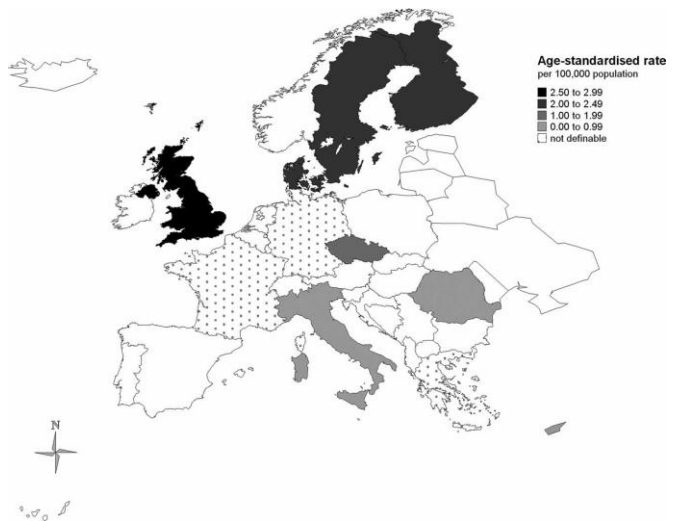
In conclusion, FbaB is the first potent *S. pyogenes* endothelial cell invasin identified. It induces an uptake process resembling that of M3 GAS, with typical features of classical phagocytosis: zipper-like uptake, F-actin accumulation at the entry port, and trafficking via the endocytic pathway with lysosomal destination are key features of the FbaB-mediated invasion mechanism of M3 *S. pyogenes*.

## 2. Einleitung

### 2.1 *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*, Gruppe A Streptokokken, GAS) ist ein bedeutender Vertreter der grampositiven humanpathogenen Bakterien. Er kolonisiert neben der Haut auch die Schleimhäute des respiratorischen Traktes und kann dabei leichte bis schwere Erkrankungen auslösen, die von Pharyngitis bis zum tödlichen toxischen Schock reichen.

Laut Weltgesundheits-organisation (WHO) stellt die Pharyngitis die am meisten verbreitete Kinderkrankheit weltweit dar. Bleiben relativ harmlose Infektionen wie eine Pharyngitis unbehandelt, oder werden nicht ausreichend behandelt, kann es zu schweren Folgeerkrankungen kommen, wie zum Beispiel dem rheumatischen Fieber (RF). Jährlich gibt es mehr als 18 Millionen Fälle von schweren GAS Erkrankungen weltweit. Während die Rate der Erkrankungen an RF in den Industrieländern seit den 1950ern

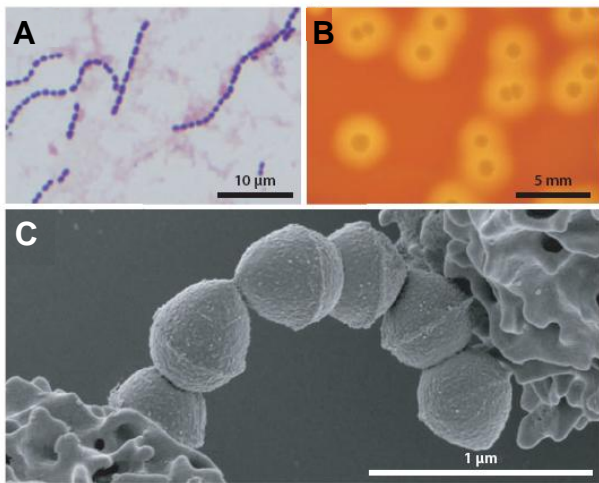


**Abbildung 2.1: Verteilung schwerer GAS-Infektionen in Europa von 2003-2004 (Lamagni et al., 2008)**

abnimmt, ist die Zahl in den Entwicklungsländern um ein Vielfaches höher. Hier reicht sie von 100 bis 200 Fällen auf 100.000 Schulkinder pro Jahr (Batzloff et al., 2004). Neben den Rheumatischen Erkrankungen können auch andere schwere invasive Erkrankungen auftreten. Als Beispiele sind hier die nekrotisierende Faszitis (NF) und das *streptococcal toxic shock syndrome* (STSS) zu nennen. In den USA gibt es jährlich 9700 Fälle von invasiven Erkrankungen, wovon 1300 tödlich enden, und auch in Nordeuropa erkranken jährlich ca. 2,5 bis 3 von 100.000 Menschen an einer schweren GAS Infektion (O'Brien et al., 2002; O'Loughlin et al., 2007). Die Verteilung der Infektionen durch Gruppe A Streptokokken in Europa ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

*Streptococcus pyogenes* ist ein ausschließlich humanpathogener Erreger, der in 5-15% aller gesunden Menschen vorhanden ist. Die durchschnittlich 0,6 µm bis 1 µm großen Kokken

sind unbeweglich und nicht fähig zur Sporenbildung (Abb. 2.2). Gruppe A Streptokokken sind fakultativ anaerob und gewinnen ihre Energie aus der Fermentation von Glukose zu Laktose.



**Abbildung 2.2: Morphologie von Gruppe A Streptokokken.** **A:** GAS, isoliert aus dem Blut eines Patienten. **B:** GAS auf Blutagarplatten. Um die Kolonien herum ist der Agar klar, was auf die beta-Hämolyse der Bakterien zurückzuführen ist. **C:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von GAS in Interaktion mit Neutrophilen. (Olsen & Musser 2010)

Als wichtiges Kriterium zur Einteilung der Streptokokken gilt ihre Fähigkeit, Erythrozyten zu lysieren. Dies kann auf Blutagarplatten in drei Arten eingeteilt werden. Die erste Form ist die sogenannte alpha-Hämolyse (auch vergrünende Hämolyse genannt). Die Vergrünung kommt hier durch die Oxidation des Eisens im Hämoglobin zustande, die das Absorptionsspektrum des Hämoglobin ändert, Erythrozyten aber nicht vollständig zerstört. Bei der zweiten Form, der beta-Hämolyse, werden die Erythrozyten hingegen vollständig zerstört. Dies äußert sich in Form von klaren Höfen um die wachsenden Streptokokken-Kolonien. Die

dritte Form der Hämolyse bezeichnet man als gamma-Hämolyse. Sie beschreibt die fehlende Hämolyse der Streptokokken auf Blutagar. Charakteristisch für *Streptococcus pyogenes* ist, dass diese Organismen rote Blutkörperchen vollständig zerstören (Abb. 2.2 B), womit sie sich von z.B. *Streptococcus pneumoniae* unterscheiden, die nur zur unvollständigen Hämolyse (Vergrünung) fähig sind.

Neben der Einteilung der Streptokokken nach ihrem Hämolyseverhalten, besteht eine weitere Möglichkeit der Einteilung nach Zellwandbeschaffenheit. Die Einteilung in die Gruppen A, B, C, D usw. aufgrund ihres C-Polysaccharides geht auf die Untersuchungen von Rebecca Lancefield Anfang der 1930er zurück (Lancefield 1933). Das C-Polysaccharid in der Peptidoglykanschicht gibt den Zellen eine feste Struktur. Darüber hinaus ist es als Antigen wirksam und bei beta-hämolysierenden Kokken speziesspezifisch. Es wird deshalb auch als Gruppenantigen bezeichnet. *Streptococcus pyogenes* ist der einzige Vertreter der Gruppe A Streptokokken und besitzt als weiteres Antigen das M-Protein, welches die Unterteilung in Serotypen gestattet. Die Typisierung beruht heute meist auf der Sequenzierung der Gene der M-Proteine (*emm*-Gene). Zurzeit sind weit über 100 verschiedene *emm*-Typen bekannt.

### 2.1.1 Superfizielle Infektionen

Als superfizielle Infektionen werden Entzündungen der Haut bezeichnet. Diese können oberflächlich sein, oder bis in die Subkutis (der untersten der drei Hautschichten) reichen.

Von *S. pyogenes* verursachte Infektionen der Haut oder Schleimhäute sind z.B. Pharyngitis und Scharlach. Jeder Mensch kann bei diesen Erkrankungen als Überträger dienen und die Bakterien innerhalb öffentlicher Einrichtungen wie Kindergärten oder Schulen übertragen und verbreiten. So sind die Hauptbetroffenen einer Pharyngitis- oder Scharlach-Infektion Kinder im Alter von 5 bis 15 Jahren. Während das Auftreten von Pharyngitis (Schleimhautinfektion) meist im Herbst/Winter verzeichnet wird, treten Hautinfektionen wie z.B. Pyodermie eher in den Sommermonaten auf.

Darüber hinaus besteht ein enger Zusammenhang von Pharyngitiden und dem RF. Serotypen der Gruppe A Streptokokken, die häufiger mit Halsinfektionen und RF in Verbindung gebracht werden konnten, sind M1, M3, M5, M6, M14, M18 (Johnson *et al.*, 1992).

Die Pyodermie ist eine sehr ansteckende, brennende oder eitrige Entzündung der Haut, die oberflächlich die Sonderform Impetigo ausbilden kann. Aber auch tiefere Hautschichten von der Dermis bis zur Subkutis können betroffen sein und es kann zur Ausbildung von Zellulitis kommen. Meist sind bei der Pyodermie Gesicht und Extremitäten betroffen. Durch Abschürfungen oder ähnliche Verletzungen können GAS in die Haut eindringen, so die Epidermis durchbrechen und eine Zellulitis auslösen. In Verbindung mit Pyodermie und akuter Glomerulonephritis stehen die Serotypen M2, M49, M57 und M60. Streptokokken-Stämme, die Pyodermie verursachen, verursachen jedoch kein RF (Dillon *et al.*, 1974).

### 2.1.2 Rheumatische Folgeerkrankungen

Das Rheumatische Fieber ist eine entzündlich-rheumatische Systemerkrankung, die in Industrieländern heute nur noch selten diagnostiziert wird. Sie entsteht als Folge einer unzureichend behandelten Pharyngitis und ist eine autoimmune Krankheit, bei der Gelenke, Haut, Herz und Nervensystem betroffen sein können. Dies kann sich in Arthritis, Carditis, Chorea, Erythema marginatum und subkutanen Knoten manifestieren. Zu diesen „Jones Kriterien“ gehören als Untersymptome z.B. Fieber und Gelenkschmerzen (Cunningham 2000).

Das Rheumatische Fieber ist die Hauptursache von erworbenen Herzkrankheiten bei Kindern weltweit, wobei Entwicklungsländer aufgrund mangelnder medizinischer Versorgung und Armut hier am stärksten betroffen sind. Symptomatisch typisch für RF ist eine Latenzzeit von 1 bis 5 Wochen zwischen einer Pharyngitis und nachfolgendem RF. Es wird vermutet, dass das Immunsystem des Wirtes in dieser Zeit eine Antwort entwickelt, die letztendlich nicht nur das Pathogen, sondern auch das beteiligte Gewebe angreift (Carapetis *et al.*, 2005; Cunningham 2000, Dinkla *et al.*, 2003). Bestimmte M-Serotypen werden mit dem RF in Verbindung gebracht. Dies sind unter anderem M1, M3, M5, M6, M14 und M18 (Stollermann *et al.*, 1991). Es wird vermutet, dass neben Herzmuskelmyosin Kollagen IV als Hauptbestandteil der Basalmembran des Endothels als Autoantigen wirken könnte (Cunningham 2000). Untersuchungen von RF-Isolaten bestätigten eine Interaktion von *S. pyogenes* mit Kollagen IV und identifizierten M3-Protein und Hyaluronsäure als Interaktionspartner. Des Weiteren konnte ein erhöhter Titer gegen Kollagen IV bei Mäusen nach der Immunisierung mit dem M3-Protein nachgewiesen werden und bestätigten die Befunde in Seren von RF-Patienten (Dinkla *et al.*, 2003).

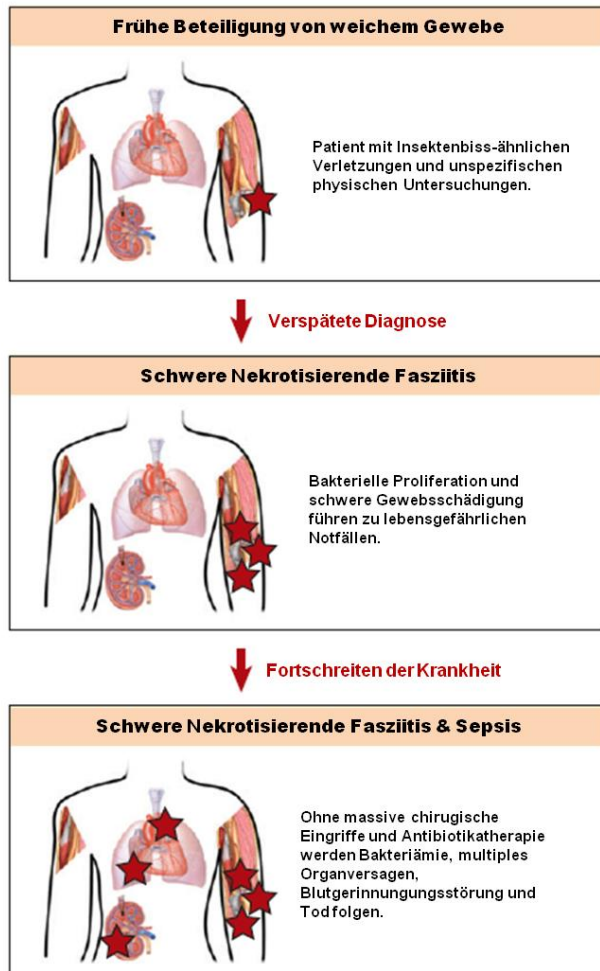
### 2.1.3 Invasive Erkrankungen

Neben den oberflächlichen Erkrankungen können Gruppe A Streptokokken auch invasive Erkrankungen, wie Sepsis, STSS und NF auslösen. Das STSS zeichnet sich durch Hypotonie und Multiorganversagen aus und kann begleitet werden von NF (Cunningham 2000). GAS können auch die vaginale Schleimhaut und den Uterus infizieren, was schwere invasive Erkrankungen und Sepsis zur Folge hat.

Bei der NF handelt es sich um eine schnell fortschreitende und höchst zerstörende, bakterielle Infektion, bei der im Wesentlichen subkutanes und tiefes Weichgewebe, sowie Muskeln betroffen sind (Olsen & Musser 2010). Von anfänglichen Hautläsionen bis zur Erkennung, mit häufig tödlichem Ausgang, vergehen nur wenige Stunden bis Tage (siehe Abbildung 2.3). Eine schnelle chirurgische Wundausschneidung innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden nach den ersten klinischen Anzeichen in Kombination mit intravenöser Antibiotikatherapie sind essentiell für das Überleben der Patienten (Wong *et al.*, 2008). Oft sind die Gewebsschädigungen so schwerwiegend, dass mehrere chirurgische Eingriffe oder sogar Amputationen nötig sind. Bei der NF kommt es zur Ausbreitung der Infektion entlang der faszialen Fläche, die angrenzende Muskelgruppen voneinander abtrennt (Tajiri *et al.*, 2008). Durch die Proliferation von GAS in einem normalerweise sterilem Gewebe, kommt es zu einer massiven Einwanderung von inflammatorischen Zellen. Das Aufeinandertreffen der bakteriellen Proteasen und anderen Virulenzfaktoren mit den gewebsschädigenden



Enzymen der Granulozyten, führt letztendlich zur schweren Gewebsschädigung (Bryant *et al.*, 2005). Bei fortschreitender Infektion wird auch die faszielle Schutzhülle durchbrochen und die nährstoffreichen Muskelfasern kommen zum Vorschein. Das Fortschreiten der NF mit dem weitläufigen Absterben von Muskelzellen wird auch als Nekrotisierende Myositis oder Myonekrose bezeichnet (Rieger *et al.*, 2007).



**Abbildung 2.3: Klinischer Verlauf der Nekrotisierenden Faszitis.** (Nach Olsen & Musser 2010)

Serotypen M59, M60 und M61 werden meist von Hautinfektionen isoliert (Cunningham 2000). Im Vergleich werden die Serotypen M1, M3 und M28 sowohl bei Pharyngitis als auch bei invasiven Erkrankungen isoliert (Aziz *et al.*, 2008). Überdurchschnittlich oft wird jedoch der Serotyp M3 mit schweren invasiven Infektionen und Tod assoziiert (Tyrrell *et al.*, 2005).

Für die Diagnose der NF gibt es keine klinischen Labortests, bildgebende Techniken oder pathognostische Erkenntnisse (Tart *et al.*, 2007). Patienten weisen meist unspezifische Symptome auf wie Fieber, höchst empfindliche Hautläsionen, Übelkeit/Erbrechen, Diarrhö und Blutvergiftung (Kaul *et al.*, 2007). Obwohl diese Faktoren auf eine NF hindeuten, müssen letztlich für eine sichere Diagnose immer chirurgische und mikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Neben einem schnellen chirurgischen

Eingriff wird so auch der aggressive intravenöse Einsatz von Antibiotika (z.B. eine Kombination aus Clindamycin, Vancomycin und Penicillin) als äußerst wichtig für eine erfolgreiche Therapie angesehen (Young *et al.*, 2005).

## 2.2 Virulenzfaktoren von *S. pyogenes*

Für leichte bis schwer invasive Infektionen, wie sie durch GAS hervorgerufen werden, bedarf es seitens der Bakterien einiger aggressiver Faktoren, um den Wirt angreifen zu können. Schwere invasive Erkrankungen, wie die nekrotisierende Faszitis sind charakterisiert durch massive Gewebsschäden, Verbreitung über die Blutgefäße und systemischen Krankheitserscheinungen, die von schwerer Krankheit bis hin zum Tode führen. In diesem Szenario müssen GAS sich schnellstmöglich an ihre Umgebung anpassen. Sie müssen (i) an die Wirtszelle anheften, (ii) Virulenzfaktoren exprimieren, die es ihnen erleichtern lokale Gewebsbarrieren zu durchbrechen und die vaskuläre Ausbreitung erleichtern und (iii) das Abwehrsystems des Wirtes umgehen.

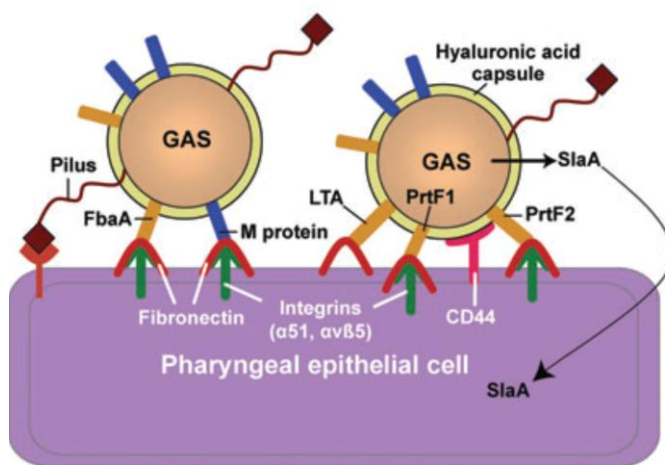
Obwohl Gruppe A Streptokokken in den letzten Jahren immer intensiver untersucht wurden, beginnen wir gerade erst die molekularen Mechanismen zu verstehen, die für die beträchtliche Virulenz verantwortlich sind. Im Folgenden sollen einige der bekanntesten Virulenzfaktoren genauer betrachtet werden.

### 2.2.1 Adhärenz- und Invasionsfaktoren von *S. pyogenes*

Ein erster und wichtiger Schritt für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes durch Bakterien besteht in der Adhäsion an das Wirtsgewebe. Hierfür haben Streptokokken von Polysacchariden bis zu Proteinen verschiedenste Adhäsionsfaktoren entwickelt, die es den Bakterien ermöglichen, an den Wirt anzuheften. Meist besitzt ein Serotyp verschiedene Adhäsionsfaktoren, die an die gleichen, oder unterschiedliche Wirtskomponenten binden können. In Abbildung 2.4 sind einige der Adhärenzfaktoren von Gruppe A Streptokokken zusammenfassend dargestellt.

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist zwischen den Zellen im sogenannten Interzellularraum lokalisiert und ist ein komplexes Netzwerk aus Proteinen und Polysacchariden. Eines der wichtigsten Bestandteile der ECM sind Kollagene. Als Protein der extrazellulären Matrix bietet es somit einen guten Angriffspunkt für *S. pyogenes*. Zwei gut untersuchte adhäsive Kollagen-bindende Proteine von GAS sind M3 und Cpa (Dinkla *et al.*, 2003; Podbielski *et al.*, 1999). Das M3-Protein ist in der Lage, über die variable und hoch spezifische N-terminale Domäne effizient an Kollagen vom Typ IV (CIV) zu binden. Es wird angenommen, dass die Kokken über die Bindung an CIV in der Lage sind große Aggregate zu bilden. Dies führt dazu, dass der Wirtsorganismus Antikörper gegen Kollagen zu bilden und somit eine Autoimmunreaktion auslöst (Dinkla *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu M3 bindet Cpa nur an Kollagen vom Typ I (CI) und kommt unter anderem in den Serotypen M1, M6, M12 und M49 vor (Podbielski *et al.*, 1999). Auch für die Hyaluronsäurekapsel des M18 Serotypes ist die Bindung an Kollagen beschrieben (Dinkla *et al.*, 2003). Die Kapsel fungiert nicht nur über die Bindung an Kollagen als Adhäsionsfaktor, sondern auch durch die Bindung an CD44, einem Oberflächenprotein von Rachenepithelzellen (Schrager *et al.*, 1998). Ein unbekapselter M24-Stamm z.B. hat eine reduzierte Virulenz, verursacht keine Läsionen und keine Bakteriämie im Mausmodell (Schrager *et al.*, 1996). Dies macht die Bedeutung der Kapsel als Virulenzfaktor deutlich.



**Abbildung 2.4: Schema der Adhärenz von GAS an Rachenepithelzellen.** Eukaryotische Proteine, die an der Adhärenz beteiligt sind, sind in weiß beschriftet. (Olsen 2009)

Neueste Erkenntnisse aus den letzten Jahren beschreiben auch Pili als Adhäsionsfaktoren von Gruppe A Streptokokken (Mora *et al.*, 2005). Für viele gramnegative pathogene Bakterien sind Pili bereits als Adhäsionsfaktoren beschrieben (Sauer *et al.*, 2000). Die Rolle von Pili in Gram-positiven Bakterien war bis vor kurzem jedoch kaum beschrieben. Alle Gene, die für Pili kodieren, liegen in der Genregion, in der auch die Gene für Fibronectin- und Kollagen-bindende Proteine, sowie dem T-Antigen liegen (FCT-

Region). Jeder Pilus besteht aus einer Hauptkomponente, an der akzessorische Proteine gekoppelt sind. Die Hauptkomponente entspricht dabei der des bisher bekannten T-Antigens und wird mittels Sortasen und Signalpeptidasen aufeinander aufgebaut. Die Tatsache, dass die akzessorischen Proteine an Proteine der extrazellulären Matrix binden, lässt vermuten, dass auch Pili an der Adhäsion und Invasion von GAS beteiligt sind (Mora *et al.*, 2005).

Ein weiterer Virulenzfaktor ist die bakteriophagenkodierte Phospholipase A<sub>2</sub> (SlaA<sub>2</sub>), die die Anheftung an Rachenepithel vermittelt. Sie ist nicht weit verbreitet unter den Serotypen, aber in fast allen M3-Isolaten vorhanden. Es konnte gezeigt werden, dass *slaA*-Mutanten eine geringere Gewebszerstörung und die Sterblichkeit von Mäusen hervorrufen. Dies und die Tatsache, dass der M3-Serotyp in Verbindung steht mit schweren invasiven Erkrankungen, legt die Vermutung nahe, dass SlaA für die Fitness der Bakterien von Bedeutung sein könnte.

*S. pyogenes* wurde lange Zeit als extrazelluläres Pathogen beschrieben. Forschungen der letzten Jahrzehnte zeigen jedoch, dass GAS Epithelzellen auch invadieren können und dort überlebensfähig sind (Molinari & Chhatwal 1999; Nitsche-Schmitz et al., 2007). Dabei sind viele bakterielle Proteine, die an der Adhäsion beteiligt sind, auch in die Invasion involviert. So konnten *in vitro* Experimente zeigen, dass die Bindung von GAS an die Wirtsoberfläche durch Kollagen-bindende Proteine, M-Protein, oder Fibronectin-bindende Proteine zu einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Aufnahme der Bakterien führt (Wang et al., 2006).

Die größte Gruppe Adhäsion-vermittelnder Proteine ist die der Fibronectin-bindenden Proteine. Einige Vertreter der Gruppe sind hinsichtlich ihres Adhärenz- und Invasionspotentials bestens untersucht. Im folgenden Abschnitt soll die Gruppe der Fibronectin-bindenden Proteine genauer vorgestellt werden.

### 2.2.1.1 Fibronectin-bindende Proteine von Gruppe A Streptokokken

Wie bereits beschrieben, besitzt *S. pyogenes* unterschiedlichste Virulenzfaktoren für die Adhäsion an und Invasion in Wirtszellen. Da Fibronectin im menschlichen Körper allgegenwärtig ist, stellt es ein ideales Angriffsziel für Pathogene dar. Zu den Fibronectin-bindenden Adhäsinen von GAS gehört zum einen die Lipoteichonsäure, die über Fibronectin die Adhäsion an orale Epithelzellen vermittelt (Beachey et al., 1982). Einige der Fibronectin-bindenden Proteine sind in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt.

Die größte Gruppe aber, stellen die Fibronectin-bindenden Proteine (FnBP) dar, die zu der Gruppe der MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) gehören. So sind für Gruppe A Streptokokken 6 verschiedene FnBP bekannt: SfbI/PrtF1 (Talay et al., 1992; Hanski & Caparon 1992), PrtF2 (Jaffe et al., 1996), FbaA (Terao et al., 2001), FbaB (Terao et al., 2002), SfbX und SOF (Courtney et al., 1999). Einige dieser Proteine sind weit verbreitet, während andere nur in bestimmten Serotypen vorhanden sind. Das *sfbI*-Gen z.B. konnte in 50%-70% aller klinischen Isolate gefunden werden (Talay et al., 1994; Natanson et al., 1995). Eine Studie aus Nordaustralien belegt, dass jedoch das komplette Set an FnBP in keinem der getesteten Stämme vorhanden war, wohl aber mindestens ein Fibronectin-bindendes Protein in 97% aller Isolate vorhanden war (Ramachandran et al., 2004). Der Grund dafür, dass Gruppe A Streptokokken verschiedene und teilweise mehr als ein FnBP aufweisen, könnte in der Fähigkeit der Bakterien liegen, verschiedene Wirtsgewebe zu kolonisieren.

Die Proteine SfbI und M1 zählen zu den am besten untersuchten FnBP von GAS. Während M1 nur im M1 Serotyp vorhanden ist, konnte SfbI bzw. seine allelische Variante PrtF1 in verschiedenen Serotypen nachgewiesen werden, wie z.B. M2, M6, M12 oder M14. Die effiziente Aufnahme der Streptokokken durch SfbI in Epithelzellen hängt dabei von zwei Regionen auf dem Protein ab. Die Interaktion des N-Terminus des Fibronektins mit den Fibronektin-bindenden *repeats* des SfbI aktiviert die benachbarte *spacer2*-Region im SfbI. Dies hat eine Bindung des *spacer2* mit der 45 kDa großen, Kollagen-bindenden Region des Fibronektins zur Folge (Talay *et al.*, 2000). SfbI ist für eine effiziente Adhäsion der Kokken an Epithelzellen notwendig und auch die Invasion der Bakterien ist von der Bindung von SfbI an Fibronektin abhängig (Talay *et al.*, 1997 & 2000). Gekoppelt an Latexpartikel führt SfbI zu einer effizienten Aufnahme der Partikel in Epithelzellen. Des Weiteren führt eine Mutation der Gene zu einer reduzierten Kapazität der Streptokokken humane Zellen zu invadieren. SfbI kann durch die Bindung an Fibronektin jedoch neben Epithelzellen auch Langerhanszellen und Endothelzellen invadieren (Okada *et al.*, 1994; Rohde *et al.*, 2003).

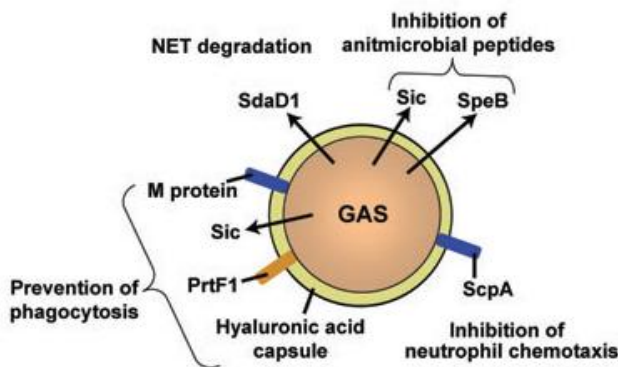
Auch M1-Protein kann über seine Fibronektin-bindende Fähigkeit Epithelzellen invadieren (Cue *et al.*, 1998). M1 Antikörper sind so zur deutlichen Reduktion des Adhäsions- und Invasionspotential von GAS M1 fähig. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass GAS M1 seine Fähigkeit zur Invasion von Epithelzellen verliert, wenn er das M1-Protein nicht exprimiert (Dombeck *et al.*, 1999).

Sowohl SfbI-Protein, als auch M1-Protein haben über ihre Bindung an Fibronektin das Potenzial in Epithelzellen zu internalisieren. Die Mechanismen, die diesen Internalisierungen zugrunde liegen, werden in Kapitel 2.3 genauer beschrieben.

### 2.2.2 Weitere Virulenzfaktoren

Besonders bekannt ist das M-Protein durch seine antiphagozytische Wirkung. Sie ermöglicht es den Streptokokken einen Angriff durch Phagozyten zu umgehen (Moses *et al.*, 1997). Zum einen kann das M-Protein durch Bindung an den Faktor H, einer regulatorischen Komponente des Komplementsystems, dessen Aktivierung inhibieren (Horstmann *et al.*, 1988). Zum anderen reduziert die Assoziation von Fibrinogen an die bakterielle Oberfläche die Fähigkeit von C3b (einer Komponente des alternativen Weges des Komplementsystems) an die Bakterien zu binden. So können die Bakterien nicht mehr ausreichend markiert und von Phagozyten aufgenommen werden (Horstmann *et al.*, 1992).

Eine Auswahl der Virulenzfaktoren von *S. pyogenes* ist in Abbildung 2.5 dargestellt.



**Abbildung 2.5: Schema über die Virulenzfaktoren von GAS, welche an der Umgehung der Immunantwort beteiligt sind (Olsen 2009).**

Auch die Hyaluronsäurekapsel vermittelt antiphagozytische Eigenschaften gegenüber Immunzellen des Wirtes. Da die bakterielle Hyaluronsäure strukturell identisch mit der des Menschen ist, hat sie keine antigene Wirkung. Im Gegenteil: sie ermöglicht es den Bakterien Antigene zu verbergen und so das Immunsystem zu umgehen (Schrager *et al.*, 1996). Drei Gene sind für die Synthese der Kapsel verantwortlich, die alle in einem Operon liegen: *hasA*, *hasB* und *hasC* (Dougherty & Rijn, 1992). Dabei sind die ersten beiden für eine Kapselexpression

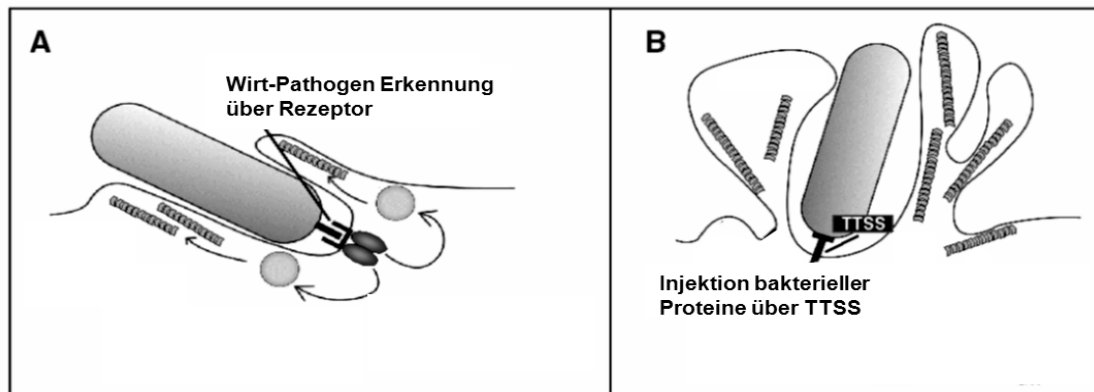
notwendig und ausreichend (Ashbaugh *et al.*, 1998).

Ein Faktor, der *S. pyogenes* während der Infektion eine Ausbreitung im Wirtsgewebe ermöglicht, ist SpeB (Olsen *et al.*, 2008). SpeB ist eine Cysteinprotease und bekannt dafür, viele Wirtsmoleküle, wie z.B. Fibronektin, Vitronectin und antimikrobielle Peptide wie LL-37, zu spalten (Chiang *et al.*, 2008). Die proteolytische Aktivität von SpeB steht in direktem Zusammenhang mit nekrotisierender Faszitis, da sie eine schnelle Ausbreitung der Bakterien im Gewebe ermöglicht (Olsen *et al.*, 2009).

Als letzter Virulenzfaktor soll an dieser Stelle noch SpyCep (ScpC, PrtS) genannt sein. Hierbei handelt es sich um ein proteolytisches Enzym, dass in invasiven Infektionen hochreguliert ist. Es liegt sowohl sekretiert als auch kovalent mittels Membrananker auf der Oberfläche der Kokken gebunden vor (Hidalgo-Grass *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2010). SpyCep spaltet IL-8, ein Chemokin, welches polymorphkernige Leukozyten rekrutiert. SpyCep spaltet IL-8 zwischen den Aminosäuren 59 und 60 (Edwards *et al.*, 2005) und verhindert somit die IL-8-abhängige Transmigration von Neutrophilen durch das Endothel. Zudem wird SpyCep ein stark inhibitorischer Effekt auf das Abtöten durch Neutrophile zugesprochen (Zinkernagel *et al.*, 2008). Die Aktivität der Leukozyten wird zusätzlich durch die Spaltung von GCP-2 (Granulozyten chemotaktisches Protein 2) durch SpyCep inhibiert (Sumby *et al.*, 2008). Des Weiteren ist beschrieben, dass SpyCep die eigene Aufnahme in Endothelzellen vermitteln kann. Dennoch wird SpyCep nicht als Invasin für Gruppe A Streptokokken angesehen, da die Protease nicht kovalent auf der Oberfläche der Bakterien gebunden bleibt. So konnten zwar SpyCep-gekoppelte Latex-Partikel von Endothelzellen internalisiert werden, jedoch keine Bakterien, die SpyCep heterolog exprimieren (Kaur *et al.*, 2010).

## 2.3 Invasionsmechanismen von *S. pyogenes*

Gram-positive Organismen haben vielfältige Invasionsmechanismen entwickelt um nicht-phagozytische eukaryotische Zellen, wie Epithel- oder Endothelzellen zu invadieren. Dabei kommt es auf der Wirtszelloberfläche entweder zu Membranausstülpungen, oder zu Membraneinstülpungen. Es gibt zwei Mechanismen für die Aufnahme über Membranausstülpungen: den *zipper* Mechanismus und den *trigger* Mechanismus.



**Abbildung 2.6: Pathogen-induzierte Invasionsmechanismen über Membranausstülpungen. A:** *zipper* Mechanismus: Aufnahme der Bakterien wird von außen über die Interaktion von bakteriellen Adhäsinen mit Oberflächenmolekülen des Wirtes vermittelt. Dies aktiviert im Wirt Signalwege, die in leichten Veränderungen des Aktinzytoskeletts und Aufnahme der Bakterien resultieren. **B:** *trigger* Mechanismus: Aufnahme der Bakterien wird durch Injektion von Effektormolekülen über das Typ III Sekretionssystem (TTSS) von innen eingeleitet. Im Wirt werden so Signalwege aktiviert die zu großen Umstrukturierungen des F-Aktins und zur Aufnahme der Bakterien führen. (modifiziert nach Alonso 2004)

Der *trigger* Mechanismus ist in Abbildung 2.6 A dargestellt und zeichnet sich durch drastische zytoskelettale Umstrukturierungen aus. Diese äußern sich in der Ausbildung von Filopodien und Lamellopodien an der Adhäsionsstelle der Bakterien. Diese Aktivität der Zellen wird auch als *membrane ruffling* bezeichnet. Der wesentliche Unterschied zwischen *trigger* und *zipper* Mechanismus ist die Richtung, von der diese angetrieben werden. Beim *trigger* Mechanismus werden bakterielle Effektorproteine in die Wirtszelle injiziert um so die Aufnahme der Bakterien einzuleiten. Der Mechanismus wird also von innen heraus, durch die injizierten Proteine, ausgelöst (Alonso 2004).

Beim *zipper*-Mechanismus (Abb. 2.6 B) hingegen kommt es durch die enge Bindung bakterieller Adhäsine an die Wirtszelloberfläche zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, infolge derer es zu Umordnungen des F-Aktinzytoskeletts und zur Aufnahme der Bakterien in die Zellen kommt. Diese Fälle sind nicht nur für Gram-negative Bakterien wie *Yersinia* beschrieben, sondern auch für Gram-positive Bakterien wie *Listeria*

(Cossart *et al.*, 2003; Irutz *et al.*, 2001) und den M1-Serotyp von *Streptococcus pyogenes* (Dombek *et al.*, 1999).

Die Aufnahme von Bakterien über Membraneinstülpungen wurde erstmals in den 1950ern als „caveolae intracellularis“ beschrieben. Es handelt sich hierbei um flache Omega-förmige Einstülpungen der Zellmembran mit einem Durchmesser von 50 – 100 nm, die auch als Caveolae bezeichnet werden (Anderson 1998). Betrachtet man elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Strukturen, sehen sie aus wie Löcher, die sich während des Aufnahmeprozesses der Bakterien bilden. Dies konnte z.B. während der Internalisierung von Gruppe A Streptokokken bestimmter Serotypen beobachtet werden (Rohde *et al.*, 2003). Caveolae wurden in verschiedensten Säugerzellen gefunden, wie z.B. Endothel- und Epithelzellen, Mastzellen und den weichen Muskelzellen. Sie werden definiert als pleomorphe Vesikel mit lateralen Anhäufungen von verschiedenen Molekülen wie Cholesterol, Caveolin-1, verschiedener Glykolipide und Glykosyl-phosphatidylinositol (GPI)-verankerte Moleküle (Anderson 1998). Sie werden von Bakterien wie z.B. dem *Mycobacterium kansasii* (Shin & Gao 2000; Baorto *et al.*, 1997; Peyron 2000), Viren wie dem HIV (Bomsel *et al.*, 2000) oder Parasiten (Mordue *et al.*, 1999; Lauer *et al.*, 2000) genutzt, um sich Zutritt zu der Wirtszelle zu verschaffen, sich in der Zelle zu bewegen, oder um wieder aus der Zelle zu entkommen. Der endozytische Weg, der durch Caveolae vermittelt wird, meidet die Fusion mit Lysosomen und verschafft den Pathogenen so einen Überlebensvorteil (Shin & Abraham 2001).

### 2.3.1 SfbI- und M1-vermittelte Invasionsmechanismen

Von den zahlreichen Oberflächenproteinen, die für Gruppe A Streptokokken beschrieben sind, sind die Wirkungsmechanismen bisher nur von zwei Adhäsinen genauer beschrieben. Hierbei handelt es sich um die Fibronectin-bindenden Proteine SfbI und M1, die in Kapitel 2.2.1.1 schon beschrieben wurden. Beide Proteine kommen in unterschiedlichen Serotypen vor und sind weder genetisch noch strukturell verwandt. Dennoch aktivieren beide ähnliche intrazelluläre Moleküle.

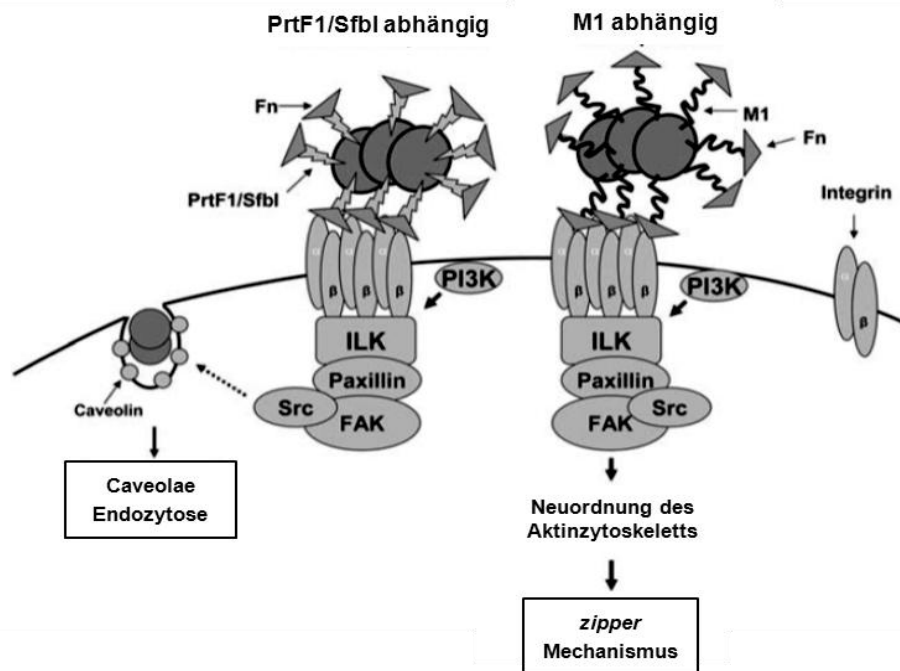
SfbI kann sowohl über seine Fibronectin-bindenden *repeats*, als auch über die N-terminal dazu gelegene *spacer* Region an Fibronectin binden. Dabei wird nie nur ein Fibronectin-Molekül an ein SfbI-Molekül gebunden. Durch das Vorhandensein von mehreren FnBR, kommt es vielmehr zu einer Bindung mehrerer Fibronectin-Moleküle an ein SfbI-Molekül (Schwarz-Linek *et al.*, 2003). Jedes Fn-Molekül ist wiederum in der Lage, an ein  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin zu binden. Durch diese Fähigkeit des Fibronectins kommt es zur lokalen



Anhäufung der Integrine (*integrin clustering*) an der Adhäsionsstelle (Ozeri *et al.*, 2001). Diese Anhäufung setzt in der Wirtszelle verschiedene Signalwege in Gang, infolge derer es zur Aufnahme der Bakterien kommt.

Auf zytoplasmatischer Seite interagiert die ILK (*integrin linked kinase*) mit dem Terminus der  $\beta_1$ -Integrine und bringt sie in Zusammenhang mit dem F-Aktinzytoskelett (Hannigan *et al.*, 1996). Des Weiteren befindet sich in der ILK eine Domäne, die direkt mit dem N-Terminus von Paxillin interagiert (Nikolopoulos & Turner 2001). Paxillin wiederum bietet verschiedene Andockstellen für Signalmoleküle und Aktinbindeproteinen (Turner 2000). Eine weitere Phosphorylierung von Paxillin durch Tyrosin-Kinasen wie Src und FAK (*focal adhesion kinase*) schafft weitere Andockstellen und reguliert so auch die Aufnahme von Pathogenen über den *zipper* Mechanismus (Jon *et al.*, 1999).

Es konnte bewiesen werden, dass sowohl die M1-, als auch die Sfbl-vermittelte Invasion abhängig ist von der Präsenz der ILK (Wang *et al.*, 2006). ILK wiederum ist, zusammen mit PI3-Kinase für die Phosphorylierung von Paxillin nötig. Im Gegensatz dazu ist Paxillin nicht essentiell für die Sfbl-vermittelte Invasion (Wang *et al.*, 2007). Vielmehr hängt dieser Prozess von der FAK (*focal adhesion kinase*) und der Src-Kinase ab, wie 2001 von Ozeri *et al.* bestätigt werden konnte. Die FAK ist assoziiert mit adhäsiven Strukturen, den fokalen Adhäsionspunkten (FA) einer Zelle, die unter anderem große Integrinaggregate beinhalten. Nach der Anhäufung von Integrinen in FA kommt es zur Autophosphorylierung der FAK, was mit der Rekrutierung der Src-Kinase einher geht (Miyamoto *et al.*, 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die kleinen GTPasen Rac und Cdc42 für die Sfbl-vermittelte Invasion notwendig sind. Beide fungieren als molekulare Schalter, die an der Induktion und Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind. Der Vorgang der Sfbl-vermittelten Invasion und der beteiligten Wirtsmoleküle ist in Abbildung 2.7 dargestellt.



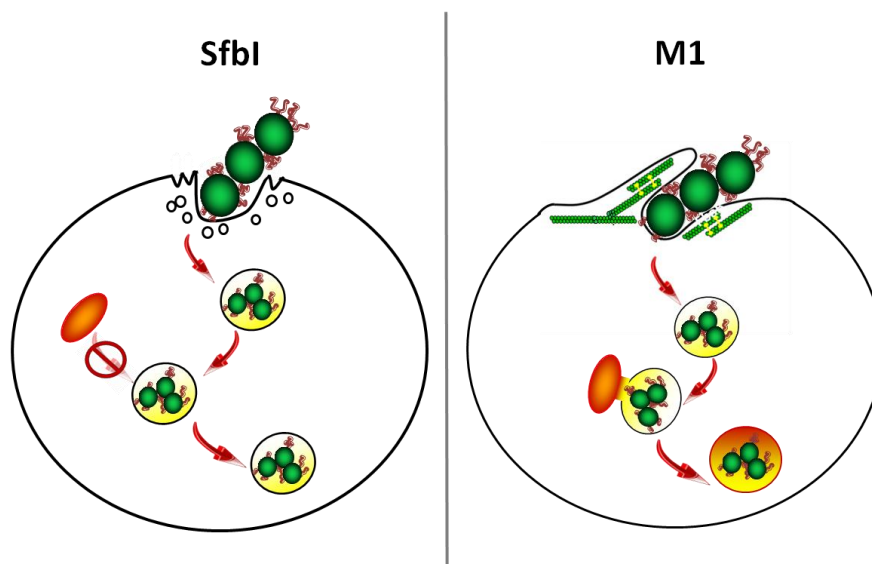
**Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der SfbI- und M1-vermittelten intrazellulären Vorgänge bei der Aufnahme von GAS.** SfbI und M1 auf der Oberfläche von GAS lösen über die Bindung an Fibronektin ein clustering von Integrinen aus. Dies bewirkt eine PI3K-abhängige Aktivierung von ILK, die wiederum die Phosphorylierung von Paxillin zur Folge hat. Diese Vorgänge führen zur Neuordnung des Aktinzytoskeletts für die Aufnahme der Kokken. (modifiziert nach Wang 2007)

Auch die durch M1-Protein vermittelten Invasionsmechanismen sind bereits gut verstanden und in Abbildung 2.7 ebenfalls schematisch dargestellt. Auf den ersten Blick erscheinen beide Invasionsmechanismen nahezu identisch zu sein, doch auf den zweiten Blick sind einige Unterschiede erkennbar. Im Gegensatz zum SfbI-Protein, kann das M1-Protein z.B. jeweils nur ein Fibronektin-Molekül binden. Im Folgenden kommt es auch im Falle vom M1-Protein zunächst zu einem Integrin clustering, was zu einer PI3-Kinase-abhängigen Aktivierung der ILK führt. Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass GAS M1 die Phosphorylierung und Rekrutierung von Paxillin zu FA induziert. Ein Prozess, der für die M1-vermittelte Invasion notwendig ist. (Wang *et al.*, 2007). Neben der Phosphorylierung von Paxillin konnte auch eine erhöhte Phosphorylierung von FAK festgestellt werden, ausgelöst durch die Bindung von M1-Protein auf der Streptokokkenoberfläche an Fibronektin.

Im Falle der M1-vermittelten Aufnahme lösen die intrazellulären Vorgänge eine Neuordnung und Polymerisation des F-Aktins am Invasionsort aus. Es kommt zur Bildung sogenannter Membranprotrusionen, auch Membranausstülpungen genannt. Die Bakterien werden von der Zellmembran umschlossen und über den zipper Mechanismus in die Zellen aufgenommen. Hierbei kommt es zur Kolokalisation von polymerisiertem F-Aktin und internalisierenden

Bakterien. Die M1-vermittelte Aufnahme folgt dem klassischen endozytischen Weg. Bakterien kolokalisieren zunächst mit Endosomen, die dann während ihres weiteren Reifeprozesses mit Lysosomen verschmelzen (Dombek *et al.*, 1999).

Im Falle der SfbI-vermittelten Aufnahme führt das *integrin clustering* zur Bildung von kleinen Löchern in der Membran, sogenannten Caveolae. Sie werden zum Adhäsionsort rekrutiert und verschmelzen dort miteinander. Die immer größer werdenden Caveolae sind so in der Lage, ganze Bakterienketten in Caveosomen aufzunehmen. Diese Streptokokken-tragenden Vesikel reifen nicht zu frühen/späten Endosomen und fusionieren auch nicht mit Lysosomen. Somit erfolgt die SfbI-vermittelte Aufnahme nicht *via* klassischer Endozytose (siehe dazu Abb. 2.8).



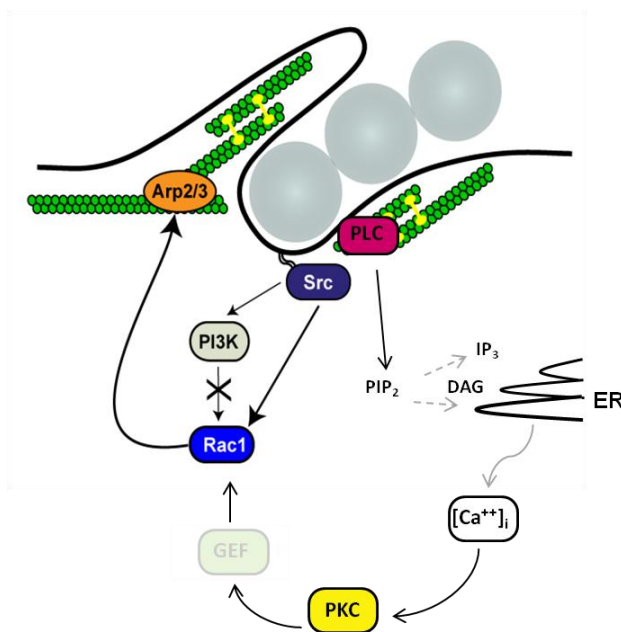
**Abbildung 2.8: Vergleich des M1- und SfbI-vermittelten endozytischen Weges.** Die M1 vermittelte Aufnahme führt über den klassischen endozytischen Weg. Bakterien werden in Endosomen aufgenommen, die mit Lysosomen zum Phagolysosomen fusionieren. Bei der SfbI-vermittelten Aufnahme kommt es zur Bildung von Caveolae am Adhäsionsort der Bakterien. Diese werden in nicht in endosomale Kompartimente, sondern in Caveosomen aufgenommen, die nicht mit Lysosomen fusionieren.

### 2.3.2 Der Invasionsmechanismus von M3 *S. pyogenes*

Schwere invasive Erkrankungen wie die nekrotisierende Faszitis oder das STSS stehen oft in Verbindung mit einem bestimmten Serotyp von *S. pyogenes*: M3. Für die Ausbreitung im Gewebe ist es für die Kokken notwendig, verschiedene anatomische Barrieren zu überwinden. Eine davon stellt das Endothel der Blutbahnen dar. Über die Interaktion von M3 *S. pyogenes* mit dem Endothel ist folgendes bekannt:

Auf der Endothelzelloberfläche, kommt es zunächst zu einer Anheftung der Bakterien an der luminalen Seite der Zellen. Diese Anheftung hat zur Folge, dass in der Zelle Signalwege angesteuert werden, die in der Umorganisation des F-Aktinzytoskeletts und der Aufnahme der Bakterien resultieren.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass es nach der Adhäsion der Bakterien zur Aktivierung der membranständigen Phospholipase C kommt (Talay *et al.*, in Revision; Nerlich *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von PLC mittels Edelfosin zur Reduktion der Internalisierung von M3 GAS um 80% führt. PLC hydrolysiert den Botenstoff Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und



**Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der intrazellulären Vorgänge während der Aufnahme von M3 GAS in Endothelzellen.** Die Adhäsion der Kokken löst intrazellulär die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) aus, was zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) führt. Dadurch kann die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden, die wiederum indirekt dafür zuständig ist, dass Rac1 in einen GTP-gebundenen Zustand versetzt werden kann, wodurch es über den Arp2/3-Komplex zur Polymerisation von Aktin und zur Ausbildung von Membranprotrusionen kommt.

Diacylglycerin (DAG). Dieser Schritt ist für die Weiterleitung von Signalen ins Zellinnere verantwortlich.  $\text{IP}_3$  fungiert als *second messenger* und bewirkt durch Bindung an die Membran intrazellulärer Calcium-Speicher, z.B. dem Endoplasmatischen Retikulum oder der Mitochondrien, die Freisetzung von Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{[i]}}$ ). Die Notwendigkeit von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{[i]}}$  bei der Invasion von M3 GAS konnte mit Hilfe von BAPTA-AM nachgewiesen werden. BAPTA-AM ist ein Chelator für intrazelluläre Calcium-Ionen. Es „fängt“ freie Ionen ein, die somit für die weitere Signalübertragung nicht mehr zur Verfügung stehen. Der Einsatz von BAPTA-AM in *in vitro* Infektionen von HUVEC führte zu einer Reduktion der Internalisierung um 95% (Talay 2010, Manuskript in Erstellung).

Freies intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}_{\text{[i]}}$  bewirkt zusammen mit DAG die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). PKC überträgt Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen und steuert somit die Aktivität nachfolgender Enzyme und Faktoren. So bewirkt sie unter anderem die Aktivierung von GTP-Austauschfaktoren (GEF), die wiederum notwendig sind, um kleine GTPasen wie Rac1 in einen aktivierten, GTP-gebundenen Zustand zu versetzen (Abbildung 2.9). Auch die Beteiligung der PKC an der

Aufnahme von M3 GAS in Endothelzellen konnte durch Inhibitionsversuche mit Calphostin nachgewiesen werden (Talay, unpublizierte Daten).

Rac1 gehört, wie Cdc42 und Rho, zu einer kleinen Gruppe GTP-bindender und spaltender Proteine, die als molekulare Schalter in der Zelle fungieren. Sie sind für Zellbewegung und Zellteilung, für die Änderung der Zellmorphologie und für Endozytosevorgänge von Bedeutung. Ihre Aktivierung hat Einfluss auf das Aktinzytoskelett und kann zur Ausbildung von Mikrospiques oder Stressfasern führen oder, wie im Falle von Rac1, zur Ausbildung von protrusiven aktinreichen Lamellipodien (Hall 2002). Die Rolle von Rac1 bei der Internalisierung von M3 GAS in Endothelzellen wurde von A. Nerlich 2009 beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass es während der Internalisierung der Bakterien am Invasionsort zu einer Anhäufung von Rac1 kommt. Durch Überexpression einer mutierten dominant negativen Form von Rac1 ließ sich die Invasionsrate von M3 GAS um 85% reduzieren. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die kleine GTPase Rac1 für die Internalisierung der Kokken notwendig ist. *Downstream* von Rac1 reguliert ein Effektor-Komplex (Arp2/3) die Aktinpolymerisation. Arp2/3-Komplexe fördern durch Ausbildung von Seitenzweigen an den Aktinfilamenten die Bildung eines zweidimensionalen baumartigen F-Aktinnetzwerkes. Mikroskopische Aufnahmen zeigten, wie auch schon für Rac1, eine Anhäufung des Komplexes um invadierende Streptokokken (Abb. 2.9).

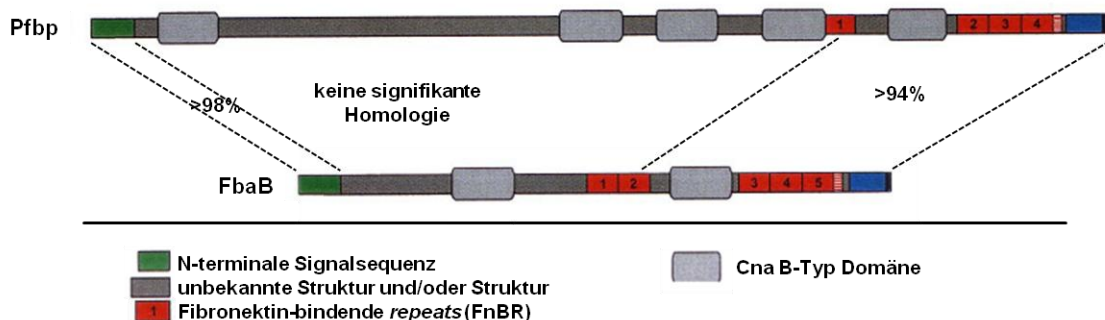
Weitere Untersuchungen wiesen eine Beteiligung von Src-Kinasen an der Aufnahme von M3 GAS in die Zelle nach. Es zeigte sich, dass die Src-Kinase für die Internalisierung der Bakterien aktiviert wird und essentiell ist. Nach Inhibierung der Kinase mit dem spezifischen Inhibitor PP2 konnte in den Endothelzellen keine Aktinpolymerisation mehr stattfinden (Nerlich 2009). Interessanterweise spielen PI3-Kinasen, die für die Sfb1 und M1-vermittelte Aufnahme wichtig ist, für die Aufnahme von M3 GAS keine essentielle Rolle. Die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) kann, alternativ zur PLC,  $PIP_2$  umwandeln. Durch Übertragung eines Phosphaterestes entsteht so  $PIP_3$ , welches ebenfalls als *second messenger* fungiert und verschiedene Proteinkinasen aktivieren kann.

Neben den intrazellulären Signalmolekülen ist auch der endozytische Weg, den M3 GAS in Endothelzellen einschlagen beschrieben. Nach der Anheftung der Bakterien auf der apikalen Seite des Endotheliums passieren sie die Zellschicht mittels Transzytose (Talay *et al.*, 2010, in Revision). Die Aufnahme, die hier über den *zipper* Mechanismus erfolgt, leitet den klassischen endozytischen Weg ein (Nerlich *et al.*, 2009). Die Kokken werden dabei in Endosomen aufgenommen, die anschließend mit Lysosomen zu Phagolysosomen verschmelzen (Talay 2010, in Revision). Die Kollokalisierung mit Endosomen und Lysosomen konnten in dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen werden. Dort verbleibt *S. pyogenes* aber nur

kurze Zeit und wird anschließend mittels Exozytose der Phagolysosomen auf der Lumen-abgewandten Seite wieder entlassen. Mit Hilfe von BSA-Gold beladenen Lysosomen konnte demonstriert werden, dass diese mit der äußeren Membran der Zelle fusionieren und die Kokken entlassen. Dass es sich hierbei um einen gerichteten Vorgang handelt, der von der apikalen zur basolateralen Seite der Endothelzellen abläuft, zeigten *ex vivo* Versuche mit menschlicher Nabelschnur. Nachdem die Kokken in die Blutgefäße der Nabelschnur gegeben wurden, waren sie nach nur zwei Stunden in der aus Kollagen bestehenden Basalmembran zu finden. Dies spricht eindeutig für eine gerichtete Durchquerung der Endothelbarriere durch M3 *S. pyogenes*.

## 2.4 FbaB

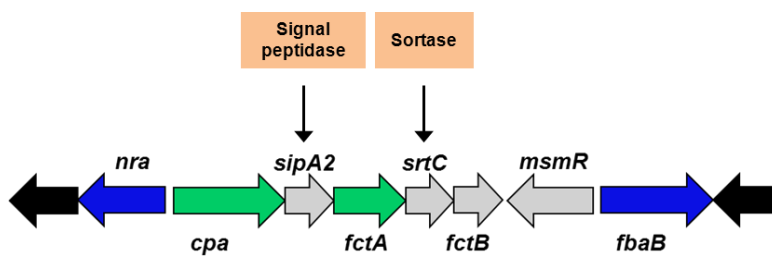
2002 beschrieben Terao *et al.* ein neues Fibronectin-bindendes Protein, welches nur im Chromosom von M3 und M18 Isolaten zu finden war: FbaB (*fibronectin binding protein of group A streptococci, type B*). Die Arbeitsgruppe testete Isolate unterschiedlicher Serotypen von Pharyngitis und STSS-Patienten hinsichtlich des Vorhandenseins des *fbaB*-Gens und der Expression des Proteins. Das Gen wurde ausschließlich in M3- und M18-Isolaten beider Krankheitsformen nachgewiesen. Das Protein jedoch wurde nur von Isolaten aus der invasiven Erkrankung STSS exprimiert. Dies stellt FbaB in einen interessanten Zusammenhang mit schweren invasiven Erkrankungen.



**Abbildung 2.10: Gegenüberstellung des *fbaB*- und *pfbp*-Gens.** Die Prozente geben die Homologie an, die durch paarweise Vergleiche der DNA-Sequenzen untereinander gefunden wurde. (modifiziert nach Ramachandran *et al.*, 2004; Schwarz-Linek 2006)

2004 beschrieb die Arbeitsgruppe um Ramachandran *et al.* eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen dem 1996 von Jaffe *et al.* beschriebenen PrtF2 und dem 1999 von Rocha &

Fischetti beschrieben Pfbp aus *S. pyogenes*. Aus 51 prtF2-Stämmen konnten zwei Amplifikate unterschiedlicher Länge generiert werden, welche im N-Terminus eine 98%ige Homologie und im C-Terminus eine 94%ige Homologie zueinander aufwiesen (Abb. 2.10). Diese Amplifikate wurden als zwei Sequenztypen des PrtF2 beschrieben: das *fbaB*-Gen und das *pfbp*-Gen. Es wird die Vermutung aufgestellt, dass sich das *fbaB*-Gen zeitlich vor dem *pfbp*-Gen entwickelt hat. Aus der Studie geht außerdem hervor, dass Stämme mit dem *fbaB*-Gen zudem selten andere Fibronectin-bindende Proteine aufweisen, im Gegensatz zu Stämmen mit dem *pfbp*-Gen.



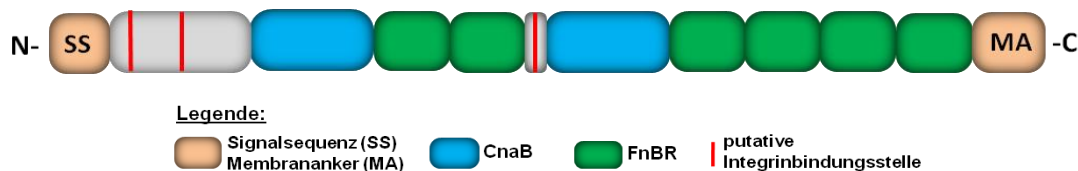
**Abbildung 2.11: Schematisches Modell der FCT-3 Region von M3 *S. pyogenes*.** Blau dargestellt sind die Gene, die hauptverantwortlich sind für die Zuordnung zum FCT-3 Typ. Grau hinterlegt sind hoch konservierte Gene. In grün sind die Gene repräsentiert, die abweichend sind. (nach Kratovac *et al.*, 2007)

Das *fbaB*-Gen liegt in der FCT-Region (*fibronectin-/ collagen-binding/ I-antigen protein genes*) des Streptokokken-Genoms (Abb. 2.8). Die FCT-Regionen sind in der Zusammensetzung und der Sequenz ihrer Gene hoch variabel. Ihr GC-Gehalt ist gegenüber dem restlichen Genom relativ niedrig und

Virulenzfaktoren finden sich hier in gehäufte Präsenz. Eine FCT-Region beinhaltet immer das *nra* Regulatorgen, oder den zu 70% homologen Genregulator *rofA*. Außerdem sind immer ein bis zwei Fibronectin-bindende Proteine und mindestens ein Kollagen-bindendes Protein (*cpa*) in dieser Genregion lokalisiert. Alle Gene liegen in einem Operon, das neben den genannten Genen auch Gene für eine Signalpeptidase und eine Sortase aufweist (Kreikemeyer & Podbielski 2005). Insgesamt sind 6 verschiedene FCT-Regionen unter den M-Serotypen bekannt; dem M3-Serotyp wird die FCT 3-Region zugewiesen (Kratovac *et al.*, 2007). In allen FCT-Regionen, die einen prtF2-Genotyp aufweisen, befindet sich davor ein *msmR*-Gen, welches das *pfbp*-Gen positiv reguliert (Nakata *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass auch das *fbaB*-Gen von diesem Regulator positiv beeinflusst wird, genaue Untersuchungen hierzu stehen jedoch noch aus.

Die FCT-Region ist jüngst dafür bekannt geworden der Ort für die Pilus-Produktion zu sein. FctA gilt dabei als Hauptkomponente der Pili und Fibronectin-und Kollagen-bindenden Proteinen wird eine akzessorische Funktion zugesprochen (Mora *et al.*, 2005). Die Rolle von FbaB in diesem Zusammenhang ist jedoch nicht bekannt.

FbaB ist ein Oberflächen-assoziiertes Protein, das über ein LPATGE-Motiv in der Membran verankert ist. Seine genetische Struktur ist sehr konserviert unter den verschiedenen annotierten Stämmen. Strukturelle Analysen haben gezeigt, dass die Fibronektin-bindenden *repeats* im C-Terminus des Proteins lokalisiert sind (Abbildung 2.8). Sie sind unterbrochen von einer Domäne mit Homologien zur B-Domäne von Cna, einem Kollagen IV Bindungsprotein von *Staphylococcus aureus*. Dieselbe Domäne ist auch im N-Terminus zu



**Abbildung 2.12: Modell über den strukturellen Aufbau von FbaB.** Vom N- zum C-Terminus sind die drei Integrinbindungsstellen DGE, RGD und IDG verteilt

finden, zusätzlich zu einer Domäne, die schwache Homologien zu Cpa hat, einem Kollagen I Bindungsprotein aus *S. pyogenes*. Des Weiteren weist FbaB als strukturelle Besonderheit drei putative Erkennungssequenzen für Integrine auf. Vom N- zum C-Terminus sind das DGE, RGD und IDG. Strukturell besitzt FbaB ein mögliches Potenzial zur Bindung an Wirtszellen.

Die Rolle von FbaB bei der Pathogen-Wirt Interaktion wurde 2002 erstmals von Terao *et al.* untersucht. So konnte FbaB eindeutig als Adhäsine für Epithelzellen nachgewiesen werden. Auch eine Rolle bei der Invasion wurde von den Wissenschaftlern favorisiert, ohne jedoch einen direkten Beweis für seine Invasions-vermittelnde Rolle zu erbringen. Es wurde lediglich gezeigt, dass eine FbaB-defiziente Mutante keine Adhärenz und keine Invasion aufweist. Da nicht adhären te Bakterien auch nicht invadieren können, steht der direkte Beweis, z.B. in Form eines *gain of function* Experiments aus. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der FbaB-defiziente Stamm in Mäusen zu einer Reduktion der Sterblichkeit führt. Diese Studie zeigt, dass FbaB ein wichtiger Virulenzfaktor der Gruppe A Streptokokken ist.



## 2.5 Ziel dieser Arbeit

*Streptococcus pyogenes* vom Serotyp M3 wird oft in Verbindung gebracht mit nekrotisierender Faszitis und dem *streptococcal toxic shock syndrome* (STSS). Diese invasiven Erkrankungen beruhen auf der Fähigkeit der Pathogene, Wirtsbarrieren zu überwinden und in tiefe Gewebe vorzudringen. Eine wichtige Barriere stellt dabei das Endothel dar. Das Endothel ist eine Schicht aus Zellen, die zum Gefäßlumen hin gerichtet ist und die innerste Wandschicht von Lymph- und Blutgefäßen auskleidet. Alle Gefäße des Herz-Kreislauf-Systems sind mit einer einzelligen Lage von Endothelzellen ausgekleidet, die als Barriere zum Gewebe dienen. In den letzten Jahren gab es einige neue Erkenntnisse über die Invasionsmechanismen von M3 *S. pyogenes* in Endothelzellen, der bakterielle Faktor jedoch, der die Invasion vermittelt, ist noch unbekannt.

Die Assoziation von Mitgliedern der PrtF2 Genfamilie im Allgemeinen (Delvecchio *et al.*, 2002) und von FbaB mit schweren invasiven Erkrankungen im Speziellen (Terao *et al.*, 2002), macht FbaB zu einem interessanten Kandidaten für die Invasion in Endothelzellen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, die Rolle von FbaB bei der Invasion von M3 *S. pyogenes* in humane Endothelzellen zu untersuchen. Mit Hilfe von *in vitro* Zellinfektionassays und verschiedener bakterieller Systeme sollten im Weiteren auch mögliche beteiligte intrazelluläre Signalmoleküle untersucht werden.

Durch Generierung heterolog exprimierender Bakterienstämme sowie der Konstruktion einer *knock-out* Mutante in *S. pyogenes* sollten Systeme geschaffen werden, die in *in vitro* Infektionsstudien zum Einsatz kommen. Dabei sollten sowohl die Infektionswege, als auch die möglichen beteiligten Signalwege analysiert werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien und Materialien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin	Applichem
Bacto Agar	Becton Dickinson
Bacto Trypton	Becton Dickinson
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson
BAPTA	Calbiochem
BSA	Sigma
Calphostin	Enzo
Calciumchlorid	Fluka
Chloramphenicol	Applichem
Colloidin Gold	BBInternational
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
EGM-2	Promocell
Ethanol	T.J.Baker
Ethidiumbromid	Roth
Edelfosine (ET-18- $\text{OCH}_3$ )	Calbiochem
Erythromycin	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
Humanes Fibronectin	Chemicon
Glutathion Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Glycerol	Roth

Glycin	Roth
HEPES-BSS	Sigma
<sup>125</sup> Iod	Hartmen Analytic
IPTG	Applichem
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Kanamycin	Roth
Lysozym	Sigma
LY294002	Calbiochem
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Manganchlorid	Merck
β-Mercaptoethanol	Serva
MOPS	Applichem
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
PMSF	Applichem
ProLong Gold antifade	Invitrogen
ProLong Gold antifade (DAPI)	Invitrogen
Proteinase K	Fluka
PP2	Calbiochem
RNase (Dnase-frei)	Applichem
Rubidiumchlorid	Sigma
Sucrose	Fluka
TEMED	Roth
Todd Hewit Broth (THB)	Becton Dickinson
Tryptic Soy Broth (TSB)	Becton Dickinson
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Serva

## 3.1.2 Oligonukleotide

Tabelle 3.1 Verwendete Oligonukleotide:

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Anmerkung
<b>rekoinantes Gesamtlänge-FbaB für Proteinaufreinigung</b>		
Fba2	cggaggatccgtaggacatgcggaaacaag	<i>Bam</i> HI Schnittstelle, forward
Fba5	gttactgtcgacttccttggtatcaaagtgg	<i>Sal</i> I Schnittstelle, reverse
<b><i>fbaB</i> für heterologe Expression in <i>S. agalactiae</i> und <i>S. gordonii</i></b>		
Fba12_ <i>Kpn</i> I	gcgggtaccgacaattggcctgtagtcttttagtttggac	<i>Kpn</i> I Schnittstelle, forward
Fba13_ <i>Xba</i> I	gcgtctagacttaaaatgacttatctagtgaaaccgagacg	<i>Xba</i> I Schnittstelle, reverse
<b><i>Knock-out</i> Mutagenese von <i>fbaB</i> in <i>S. pyogenes</i> A60</b>		
Fba-upF	gcgaattcgatggattgttgttggaagtc	forward
Fba-upR	gatggtatatccagtataattttctcattattttctaactccacattcctaagcg	reverse
catF	atggagaatttaactactggatatacttccgttga	forward
catR	ttacgcgacgccctgctactcatcgagttctgttgta	reverse
Fba-doF	tactgcatgagtgaggcagggcgggcgtaactgttggtgacaatagcgaaaaag	forward
Fba-doR	gcgaattcagcttcgatgctgttttagttcgtat	reverse

## 3.1.3 Antikörper

Tabelle 3.2 Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Kaninchen Anti- <i>S. gordonii</i> Serum, polyklonal	1:100	Talay, <i>et al.</i> , (2000)
Kaninchen Anti- <i>S. pyogenes</i> Serum, polyklonal	1:100	Molinari, <i>et al.</i> , (1997)
Kaninchen Anti- <i>S. agalactiae</i> IgG, polyklonal	1:100	ACRIS (Heidelberg)
Kaninchen Anti-FbaB IgG, polyklonal	1:200	Diplomarbeit S. Amelung
Kaninchen Anti-Maus IgG Alexa Fluor® 488	1:200	Molecular Probes
Kaninchen Anti-Maus IgG Alexa Fluor® 568	1:300	Molecular Probes
Ziege Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 488	1:200	Molecular Probes
Ziege Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 568	1:300	Molecular Probes
Ziege Anti-Kaninchen IgG Cy5	1:200	Dianova
Maus Anti-EEA1 IgG, monoclonal	1:50	BD
Maus Anti Lamp-1 IgG (Klon H4A3), monoclonal	1:50	BD
Anti-Phalloidin IgG Alexa Fluor® 488	1:200	Molecular Probes

## 3.2 Verwendete Bakterien

### 3.2.1 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 3.3 Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Plasmid	Insert	Kulturbedingungen	Referenz
<i>E. coli</i> HB101	pGEX-6P-1	-	100 µg/ml Ampicillin	Invitrogen
<i>E. coli</i> MC1061	pDCerm	-	500 µg/ml Erythromycin	Zur Verfügung gestellt durch Prof. V. Nizet, UCSD, San Diego
<i>E. coli</i> MC1061	pHY304	-	500 µg/ml Erythromycin, 30°C	Zur Verfügung gestellt durch Prof. V. Nizet, UCSD, San Diego
<i>E. coli</i> HB101	pEGFP-C1	-		Clontech
<i>E. coli</i> HB101	pEGFP-C1	wtRac1		Zur Verfügung gestellt von Prof. Ingo Just (MH-Hannover)
<i>E. coli</i> HB101	pEGFP-C1	N17Rac1		Zur Verfügung gestellt von Prof. Ingo Just (MH-Hannover)
<i>E. coli</i> DH5α	pTagRFP-N1	PX-Domäne		Zur Verfügung gestellt von Dr. A. Nerlich
<i>E. coli</i> DH5α	pTagRFP-N1	PAK-CRIB		Zur Verfügung gestellt von Dr. A. Nerlich

Tabelle 3.4 Verwendete Streptokokken Stämme

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Kulturbedingungen	Referenz
<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> A60	<i>emm3</i>	-	AC-243, invasives Blutisolat des Klinikums Aachen
<i>Streptococcus</i> <i>gordonii</i> GP 1221	W ( <i>aphA3</i> ; <i>Demm6</i> ; <i>DermC</i> ) Km <sub>R</sub>	200 µg/ml Kanamycin	Ogginio und Pozzi (1996)
<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i> GBS102	Ia	-	Klinisches Isolat, Stammsammlung HZI (Kaur <i>et al.</i> , 2010)

### 3.2.2 Medien zur Kultivierung der Bakterien

Vor Gebrauch wurden die folgenden Komplexmedien für die Kultivierung der Bakterien durch 15minütiges Autoklavieren bei 1 bar Überdruck und 121°C sterilisiert.

#### LB-Medium (Luria-Bertani)

---

Bacto Trypton	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

#### Tryptic Soy Broth (TSB)

---

TSB Medium Powder	30 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

#### Todd Hewitt Broth (THB)

---

THB Medium Powder	36,4 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien vor dem Autoklavieren jeweils 15,0 g Agar pro Liter zugesetzt.

### 3.2.3 Stammhaltung und Kultivierung

*E. coli* wurde in flüssigem LB-Medium, gegebenenfalls unter selektiven Bedingungen mit entsprechenden Antibiotika, über Nacht bei 120 rpm und 37°C angezogen. Auf LB-Platten wurden *E. coli* Kulturen bei 4°C bis zu 6 Wochen aufbewahrt. Für eine langfristige Stammhaltung wurden 0,75 ml einer Übernachtskultur mit 150 µl einer 86%igen Glycerinlösung vermischt und bei -70°C gelagert.

Die Kultivierung von *S. gordonii*, *S. pyogenes* und *S. agalactiae* erfolgte in Flüssigmedium unter Zusatz entsprechender Antibiotika stehend über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Zur Anzucht für Infektionsversuche wurde TSB-Medium verwendet.

Zur langfristigen Stammhaltung wurde wie bei den *E. coli* Stämmen verfahren, jedoch wurden *S. agalactiae* und *S. pyogenes* in THB und *S. gordonii* in BHI angezogen.

**Tabelle 3.5: Selektionsbedingungen verwendeter Stämme**

Stamm	Plasmid	Kulturbedingungen
<i>E. coli</i> TOP10	pCR2.1 $\Delta$ <i>fbaB</i>	50 µg/ml Kanamycin
<i>E. coli</i> MC1061	pCR8 <i>fbaB</i>	100 µg/ml Spectinomycin
<i>E. coli</i> MC1061	pDC <i>fbaB</i>	500 µg/ml Erythromycin
<i>E. coli</i> MC1061	pHY $\Delta$ <i>fbaB</i>	500 µg/ml Erythromycin
<i>S. gordonii</i> GP1221 (SGO)	pDCerm	5 µg/ml Erythromycin
<i>S. gordonii</i> GP1221 (SGO)	pDC <i>fbaB</i>	5 µg/ml Erythromycin
<i>S. agalactiae</i> (GBS)	pDC <i>fbaB</i>	5 µg/ml Erythromycin
<i>S. pyogenes</i> (GAS)	pHY304	5 µg/ml Erythromycin
<i>S. pyogenes</i> $\Delta$ <i>fbaB</i> (GAS)	-	1 µg/ml Chloramphenicol

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Isolierung chromosomaler- und Plasmid-DNA

Plasmid-DNA, welche für eine weitere Klonierung und Transformation nach *Streptococcus* verwendet wurde, wurde mit Hilfe des QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Hierfür wurde eine Kultur von 15 ml über Nacht bei 120 rpm und 37°C im Luftschüttler angezogen. Von dieser Kultur wurden 2 x 2 ml bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach erfolgreicher Aufreinigung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.



Plasmide für die Transfektion in HUVEC wurden mit dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die aufgereinigte Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

### 3.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 3.3.2.1 Standard PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich DNA-Fragmente definierter Sequenz und Länge amplifizieren. Diese Methode wurde für eine *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente und für eine anschließende Klonierung angewendet (nach Saiki *et al.*, 1985). Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra) nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

#### Standard PCR-Ansatz

10-100 ng	Template-DNA
2 µl	10x PCR-Puffer (Qiagen)
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM; Qiagen)
2 µl	dNTP (2 mM; Fermentas)
1 µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)
0,2 µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl; Qiagen)
ad 20 µl	MQ-H <sub>2</sub> O

#### Standard PCR-Programm

25 x	1.	96°C	4:00 min	Vor-Denaturierung
	2.	94°C	0:40 min	Denaturierung
	3.	T <sub>A</sub>	0:30 min	Annealing
	4.	72°C	T <sub>E</sub> min	Elongation
	5.	72°C	5:00 min	Endpolymerisation
	6.	4°C	∞	

$T_A$  = Annealing-Temperatur, primerspezifisch; 5-10°C unterhalb der theoretischen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der verwendeten Primer

$T_E$  = Elongationsdauer, abhängig von der Prozessivität der Polymerase; für verwendete Taq DNA Polymerase (Qiagen) ~1 kb pro Minute

### 3.3.2.2 Kolonie PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode, um Wirtsbakterien, die nach Transformation das erwünschte rekombinante Plasmid tragen, zu identifizieren. Dafür werden neben Insert-spezifischen Primern (z.B. PCR-Primer, mit deren Hilfe das Insert amplifiziert wurde) auch Vektor-spezifische Primer eingesetzt, die das integrierte Gen flankieren. In dieser Diplomarbeit wurden für die Kolonie-PCR Insert-spezifische Primer verwendet.

Einzelne *E.coli*-Kolonien wurden dafür mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 22,2 µl sterilem MQ-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien und zur Freisetzung der DNA wurden die Ansätze anschließend für 10 Minuten bei 96°C gekocht. Die Ansätze wurden schließlich mit den übrigen Komponenten auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt und dem Standard PCR-Programm unterzogen

### 3.3.3 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C optional zwischen 1 bis 3 Stunden, oder über Nacht.

#### Standard Restriktionsansatz

1-10 µg	DNA
1 µl	Restriktionsenzym I (20 U/µl)
1 µl	Restriktionsenzym II (20 U/µl)
2-4 µl	10x NEB Puffer
ad 46 µl	MQ-H <sub>2</sub> O

### 3.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wird ein DNA-Strang mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe mit dem einer freien 5'-Phosphatgruppe unter ATP-Verbrauch verknüpft. Zur Katalyse der Reaktion wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) eingesetzt. Dieses Enzym ist in der Lage, entsprechend geschnittene DNA-Fragmente kovalent miteinander zu verknüpfen, so dass ein durchgehender DNA-Doppelstrang entsteht.

Die zu ligierenden DNA-Fragmente und Vektoren wurden hierfür zunächst mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend mit Hilfe eines PCR-Purification Kits (QIAGEN) aufgereinigt. Die Inkubation des Ligationsmixes erfolgte über Nacht bei 16°C in einem Thermocycler.

#### T4- Ligasemix

1-2 µg	geschnittenes DNA-Fragment
200 ng	geschnittener VeKtor
1 µl	10x T4-Ligasepuffer (NEB)
0,3 µl	T4-DNA-Ligase (400U/µl, NEB)
ad 10 µl	MQ-H <sub>2</sub> O

### 3.3.5 Transformation von Bakterien

#### 3.3.5.1 Transformation von *E. coli*

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* HB101 und *E. coli* MC1061 wurden folgende Medien benötigt:

<u>SOB-Medium</u>	20 g	Bacto Tryptone
	5 g	Bacto Yeast
	0,6 g	NaCl
	2,5ml	1M KCl
	add H <sub>2</sub> O to 1l	

<u>Tfbl-Medium</u>	588,84 mg	Kalium Acetat	(=30mM)
	2,4 g	Rubidiumchlorid	(=100mM)
	294 mg	Calciumchlorid	(=10mM)
	1,62 g	Manganchlorid	(=50mM)
	30 ml	Glycerol	
	mit dH <sub>2</sub> O auf 200ml auffüllen		
	(pH mit CH <sub>3</sub> COOH auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren)		

<u>TfblI-Medium</u>	46,24 mg	MOPS	(=10mM)
	220,53 mg	Calciumchlorid	(=74mM)
	24,184 mg	Rubidiumchlorid	(=10mM)
	3 ml	Glycerol	
	mit dH <sub>2</sub> O auf 200ml auffüllen		
	(pH mit CH <sub>3</sub> COOH oder NaOH auf 6,5 einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren)		

Zunächst wurde von den Stämmen eine Starterkultur in 1,5 ml SOB Medium angesetzt und schüttelnd inkubiert bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden 100 ml SOB-Medium mit 1 ml Starterkultur versetzt und bei 115 rpm und 37°C für 2 bis 3 Stunden bis zur OD<sub>578</sub> von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Nach Erreichen der optischen Dichte wurden die Kulturen für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml Tfbl resuspendiert und wieder für 10 min zentrifugiert (s.o.). Anschließend wurde das Pellet in 4 ml TfblI resuspendiert und wieder für 15 min auf Eis abgekühlt. Nach der Kühlungsphase wurden die nun kompetenten Zellen in vorgekühlte Eppis aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Nutzung bei -80°C gelagert.

Für die Transformation der *E. coli* wurden 200 µl kompetente Zellen mit 50 µl Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dies bewirkt eine Anlagerung der DNA an die Zellmembran. Ein anschließender Hitzeschock für 3 min bei 43°C lässt die Membran kurzzeitig porös werden und ermöglicht somit die Aufnahme der DNA. Nach der Inkubation für 60 min bei 37°C in 1 ml LB-Medium unter Schütteln erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 min. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Danach

wurden 150 bzw. 50 µl auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht zur phänotypischen Expression inkubiert. Die Überprüfung der Transformation erfolgte mittels Kolonie-PCR.

#### 3.3.5.2 Transformation von *S. agalactiae*

Um *Streptococcus agalactiae* aufnahmefähig für DNA zu machen, wurden die Bakterien über Nacht in 5 ml THB + 0,6% Glycin bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurde eine frische Kultur aus 45 ml THB + 0,6% Glycin und 5 ml der Übernachtskultur angesetzt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~0,3 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien bei 4000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Daraufhin folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 25 ml 0,625M Sucrose, ein Waschschriff mit 15 ml 0,625M Sucrose und ein letzter mit 10 ml 0,625M Sucrose. Zwischen jedem Waschschriff wurde die Bakteriensuspension bei 4000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Nach dem letzten Waschschriff wurde das Pellet in 200-300 µl Glycerol (20%) aufgenommen, in 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung lagerten die kompetenten GBS bei -70°C.

Bei RT wurden zu 50 µl kompetente Bakterien 5 µl Plasmid DNA gegeben. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA durch die Bakterien wurde der Ansatz von 55 µl anschließend kurz bei 1,6 kV elektroporiert und dann in 250 µl antibiotikafreiem THB-Medium verdünnt. Nun erfolgte stehend eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für mindestens 2 Stunden. Anschließend wurden 50 µl bzw. 200 µl des Transformationsansatzes auf THB-Platten mit jeweils 2 µg/ml Erythromycin ausgestrichen. Die Platten wurden für 1-2 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und Erythromycin-resistente Kolonien mittels Kolonie-PCR überprüft.

#### 3.3.5.3 Transformation von *S. gordonii*

*Streptococcus gordonii* ist ein apathogener Kommensale der menschlichen Mundhöhle, der sich durch eine natürliche Kompetenz auszeichnet (Pakula et al. 1958).

Die Induktion der Kompetenz durch chemische Vorbehandlung, wie bei *E. coli*, ist bei *S. gordonii* nicht erforderlich, da die Zellen in der frühen logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>590nm</sub> 0,05 – 0,2) zur natürlichen DNA-Aufnahme (Kompetenz) fähig sind. Dazu wurden 50 ml vorgewärmtes BHI-Medium mit 200 µg/ml Kanamycin und 10% hitzeinaktiviertem FCS versetzt und mit 1,5 ml einer Übernachtskultur von *S. gordonii* GP1221 beimpft und stehend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Aus früheren Versuchen der Arbeitsgruppe geht hervor,

dass die Bakterien im Bereich von OD<sub>600nm</sub> von 0,174 die beste Kompetenz aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Inkubation bei dieser optischen Dichte gestoppt, jeweils 1,5 ml Kultur mit 0,3 ml 50% Glycerol vermischt und bis zur Transformation bei -70°C gelagert. Zur Transformation von *S. gordonii* GP1221 wurde ein Aliquot kompetenter Bakterien für einige Minuten bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde zu 450 µl kompetenten Zellen eine Mischung aus ca. 0,5 µg Plasmid-DNA, 0,5 µl 20xSSC-Puffer und 50 µl MQ-H<sub>2</sub>O gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl und 50 µl des Ansatzes jeweils direkt auf BHI mit 2 µg/ml Erythromycin ausplattiert.

#### 3.3.5.4 Transformation von *S. pyogenes*

Um den M3-Serotyp *Streptococcus pyogenes* A60 kompetent zu machen, wurde der Stamm zunächst über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in TSBY angezogen. Am nächsten Tag wurde aus dieser Übernachtskultur eine frische Kultur in TSBY+2% Glycin im Verhältnis 1:10 angesetzt. Die frische Kultur wurde anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,1 bis 0,2 inkubiert. Nun wurden 3x50 ml für 10 Minuten bei 5000rpm und 6°C zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 25 ml doppelt destilliertem eiskaltem Wasser, wurde es final in 1 ml Eiswasser resuspendiert. Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurden zu 200 µl der Bakteriensuspension je 5 µl Vektor gegeben und bei 1,6 kV elektroporiert und auf 15 ml mit TSBY aufgefüllt.

Im Falle einer Transformation mit einem temperatursensitiven Vektor (z.B. pHY304), wurden die Bakterien ohne Antibiotikum bei 30°C inkubiert. Nach 4 Stunden wurde die Kultur auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und mit Antibiotika (0,3 µg/ml Erythromycin) über Nacht bei 30°C vorselektioniert. Am nächsten Tag wurde die Kultur dann für 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert wurde, wurden je 10 µl und 100 µl der Suspension in TSBY-Agar mit jeweils 0,3 µg/ml Erythromycin eingegossen. Die Platten wurden nun wieder bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden.

Im Falle einer Transformation mit einem thermostabilen Vektor (z.B. pDCerm), wurde die Bakteriensuspension in 7 ml TSBY aufgenommen und für mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Für eine Selektion auf plasmidtragende Bakterien wurden anschließend 15 µl, 25 µl und 50 µl auf THY-Platten mit jeweils 1,5 µg/ml Erythromycin ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

### 3.3.6 Mutagenese von *S. pyogenes*

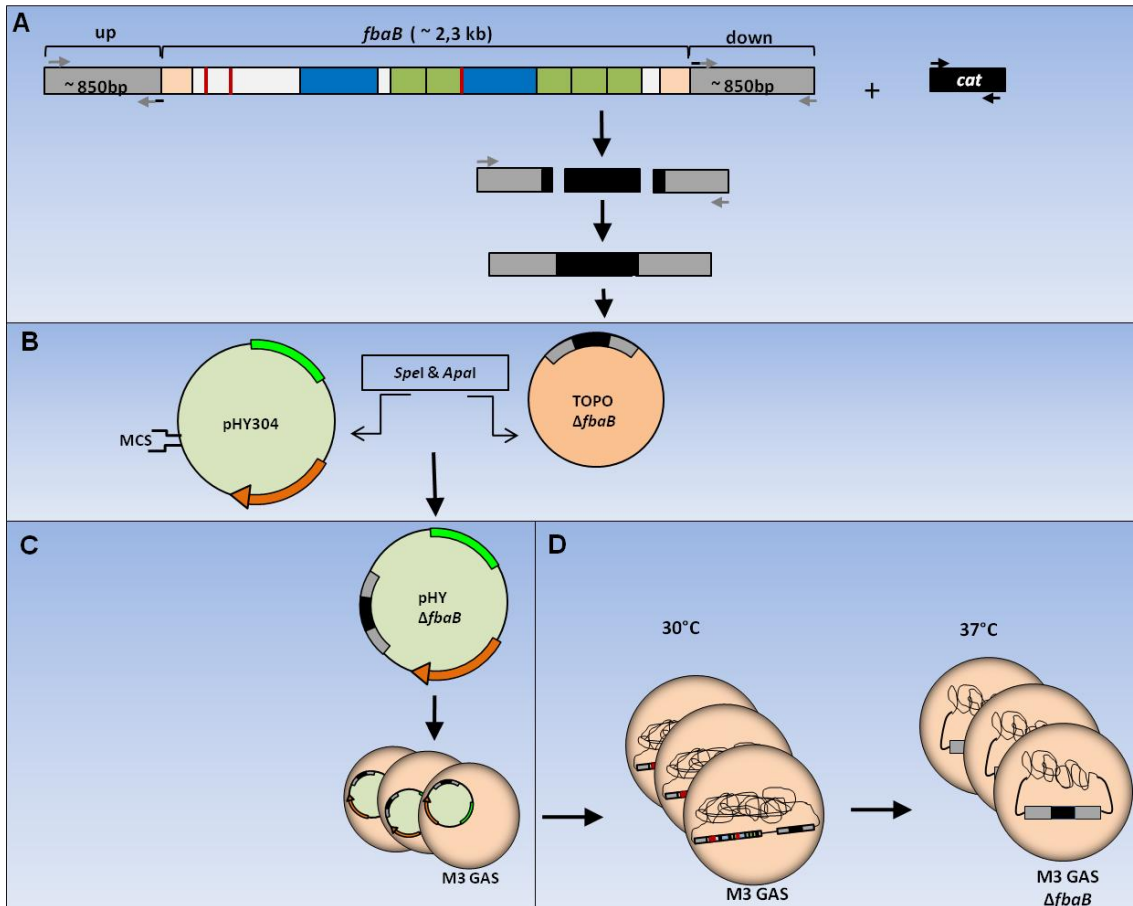
Um eine *fbaB-knockout* Mutante zu erhalten, sollte das *fbaB*-Gen gegen das Chloramphenicol Acetyltransferase (*cat*) Antibiotikaresistenzgen ausgetauscht werden.

Zunächst wurden hierfür Fragmente *upstream* und *downstream* vom *fbaB*-Gen amplifiziert, welche das Gen flankieren. Die Primer, die hierfür benutzt wurden sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. *FbaB-upR* und *FbaB-doF* sind um 30 bp verlängert. Diese Verlängerung entspricht genau den 30 bp des 5', bzw 3'-Endes des *cat*-Gens. Mit den Primern *FbaB-upF* und *FbaB-upR* wurde also ein Fragment amplifiziert, welches unmittelbar vor dem Start-Codon des *fbaB*-Gens liegt und gleichzeitig homolog ist zu den ersten 30 bp des *cat*-Gens. Die Primer *FbaB-doF* und *FbaB-doR* wiederum amplifizierten ein Fragment, das am 5'-Ende um 30 bp homolog ist zum *cat*-Gen und am 3'Ende homolog ist zum *fbaB*-Fragment, das direkt hinter dem Stop-Codon des *fbaB*-Gens beginnt (siehe Abbildung 3.1 A).

Als nächstes wurde eine „triple“ PCR durchgeführt um die Fragmente *fbaB-up*, *fbaB-down* und *cat* zusammenzuführen. Enstanden ist so ein Fusionsprodukt in dem das *fbaB*-Gen durch das *cat*-Gen ausgetauscht ist (Abb. 3.1 A). Dieses PCR-Produkt wurde nun mittels des Invitrogen TA-cloning Kit in den Vektor pCR8/GW/TOPO kloniert und gesichert. Für die Mutagenese von M3 GAS wurde das Konstrukt als nächstes in den Temperatur-sensitiven *shuttle*-Vektor pHY304 kloniert (Abb 3.1 B). Es entstand der knockout-Vektor pHYΔ*fbaB*, welcher nun wie unter 3.3.5.4 beschrieben in *S. pyogenes* transformiert wurde (Abb. 3.1 C).

Die erhaltenen Einzelkolonien wurden mit Hilfe von Plasmid-Primern hinsichtlich der erfolgreichen Transformation von pHYΔ*fbaB* untersucht. Via heterologer Rekombination sollte das Δ*fbaB*-Fragment in das Chromosomen von M3 GAS A60 integrieren und so eine Deletion des *fbaB*-Gens und eine Insertion des *cat*-Gens hervorrufen.

pHY304 ist ein temperatursensitiver Vektor, der nur bei 30°C repliziert. Transformanden, die auch bei 37°C wachsen, müssen also das *cat*-Resistenzgen ins Chromosom integrieren um auf Chloramphenicol (Cm) bei 37°C wachsen zu können.



**Abbildung 3.1: Modell der Mutagenese von M3 *S. pyogenes* A60 zur Konstruktion einer *fbaB* – knockout Mutante.**

Positive Klone wurden daher weiter bei 30°C und parallel bei 37°C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die 37°C-Kultur auf THB a) mit 2 µg/ml Chloramphenicol, b) mit 3 µg/ml Erythromycin (Erm) und c) ohne Antibiotika ausgestrichen. Kolonien, die sich als Cm- und Erm-resistent erwiesen, stellen Einzel-X-Over dar. Um ein Doppel-X-Over zu bekommen, wurden diese Einzelkolonien wieder wie bereits beschrieben bei 30°C und parallel bei 37°C inkubiert, jedoch diesmal ohne Antibiotikum. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C in Flüssigkultur erfolgte allerdings ein Screening auf THB-Platten mit den jeweiligen Antibiotikakonzentrationen. Kolonien, die sich als Cm-resistent und Erm-sensitiv erwiesen, stellten *Doppel-Cross-Over* dar.



## 3.4 Biochemische Methoden

### 3.4.1 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Sie wurde 1970 von Ulrich Laemmli entwickelt und ist die meist zitierte Arbeit unsere Zeit. Durch Inkubation der Proteine mit SDS werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine; die stark negative Ladung von SDS gleicht alle Ladungen der Proteine aus, so daß in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Somit ist die Retention im Gel abhängig von der Größe des Moleküls und damit proportional zur relativen Molekülmasse. Mit dieser Methode erhält man Informationen über das Molekulargewicht von Proteinen.

Die Proteinproben wurden hierfür zunächst mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 bis 10 Minuten bei 95°C aufgekocht und auf das SDS-Gel aufgetragen. In einem 4%-igen Sammelgel erfolgte die Fokussierung der Proteine, die anschließend in einem 12%-igen Trenngel aufgetrennt wurden. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer standardmäßig bei 170 Volt pro Gel in einem Mini-PROTEAN 3 System (BioRad). Als Größenmarker diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Nach abgeschlossener SDS-PAGE wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel für eine Coomassie-Färbung eingesetzt. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie R-250 Brilliant Blue gefärbt. Dazu wurde das Gel kurz in der Mikrowelle mit Coomassie-Färbelösung aufgekocht. Die Entfärbung erfolgte durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle mit ddH<sub>2</sub>O. Das erhaltene Bandenmuster wurde durch Trocknung der Gele und Einscannen dokumentiert.

### 3.4.2 Überexpression und Aufreinigung

#### 3.4.2.1 Überexpression rekombinanter Proteine

Aus positiven *E. coli* Transformanten wurde zunächst das entsprechende Plasmid isoliert um die Gensequenz des gewünschten Proteins auf seine Sequenzgenauigkeit überprüfen zu können. Transformanten mit der richtigen Gensequenz wurden anschließend im Rahmen einer *small-scale*-Expression auf ihre Expressionsfähigkeit hin getestet. Hierfür wurden 6 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 6 ml einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft, die eine OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,7 aufwies und dann mit 1 mM IPTG induziert. Vor der Induktion wurde 1 ml Kultur abgenommen, bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert (Biofuge, Heraeus) und das

Pellet bei -20°C gelagert. Zur Expression des GST-Fusionsproteins erfolgte eine dreistündige Inkubation der induzierten Kulturen bei 30°C unter Schütteln, oder wahlweise über Nacht. Das Pellet aus 1 ml Kultur wurde in 200 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert, 10 min bei 95°C aufgeköcht, kurz zentrifugiert und für die Analyse in einem 12%-igen SDS-Gel eingesetzt. Die Bakteriensedimente der nicht induzierten Kultur wurden auf gleiche Weise behandelt und dienten als Negativkontrolle. Für eine Proteinproduktion in großem Maßstab (*large-scale*) erfolgte eine Anzucht der Klone in 5 x 125 ml LB-Medium bis zur optischen Dichte von ca. 1 bei 600 nm. Durch die Zugabe von 125 ml frischem LB-Medium und 1 mM IPTG wurde die Expression der Fusionsproteine induziert und über Nacht bei 30°C und ~120 rpm fortgesetzt. Anschließend wurden die Bakterien durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 7000 rpm und 4°C geerntet (Rotor SLA-3000, RC5C-Zentrifuge; Sorvall). Alle Pellets wurden in 20 ml PBS resuspendiert, vereinigt, nochmals zentrifugiert und bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

#### 3.4.2.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine wurde die spezifische Bindung von GST an Gluthation-Sepharose (Gluthation-Sepharose 4 Fast Flow; GE Healthcare) genutzt. Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgte mittels GST-Affinitäts-Chromatographie. Glutathion liegt hierbei als Ligand immobilisiert auf einer Sepharose-Matrix vor. Bei der Zugabe der Bakterienlysate kommt es zu einer Bindung des GST-Fusionsproteins über seinen GST-tag an den Liganden, so dass andere Proteine und Verunreinigungen durch Waschen der Matrix entfernt werden können. Unter milden, nicht denaturierenden Bedingungen erfolgt anschließend die kompetitive Elution der Fusionsproteine mit Glutathion-haltigem Puffer.

Dazu wurden die gefrorenen Pellets nach dem Auftauen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 5 ml PBS aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte nach der Zugabe von 1 mM PMSF und einer Spatelspitze Lysozym mittels French-Press (SLM-Aminco; 40.000 PSI) bei 1000 bar. Durch Zentrifugation (30 min bei 15.000rpm; 4°C; SS-34 Rotor) wurde das bakterienfreie Lysat von den Zelltrümmern für die weitere Aufreinigung getrennt.

Nachdem 3 ml Gluthation-Sepharose mit 6 ml PBS äquilibriert wurde, erfolgte die Kopplung von 6 ml bakterienfreien-Lysats an die Sepharose-Matrix für 1 Stunde rollend bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 700 rpm wurde das Sepharosebett 3-mal mit dem 2-3fachen Bettvolumen PBS gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte 3-

mal mit jeweils 3 ml Elutionspuffer. Anschließend erfolgte über Nacht eine Dialyse der Fraktionen gegen 1 Liter PBS.

Die Entfernung des GST-Tags vom GST Fusionsprotein erfolgte durch den Verdau mit PreScission Protease. Die PreScission Protease ist ein Fusionsprotein aus Glutathion S-Transferase und einer Typ 143C Protease des humanen Rhinovirus (HRV). Die Protease erkennt spezifisch die Aminosäuresequenzen Leu-Phe-Gln/Gly-Pro und schneidet diese an der Stelle Gln und Gly. Da die Protease mit GST fusioniert ist, erfolgt die Aufreinigung des Verdau an Glutathion-Sepharose Matrix.

Für diesen Verdau wurden zu 200 µg Protein (in PBS) 240 µl Cleavage Puffer und 10 µl PrecisionProtease gegeben und über Nacht in einer Slide-A-Lyzer Dialysekassette (0,5–3 ml; 10 kDa Ausschlussgröße; Pierce) gegen Cleavage Puffer dialysiert. Am nächsten Tag erfolgte die Reinigung der Proteine für 1 Stunde mittels Glutathion-Sepharose bei Raumtemperatur. Nach erneuter Dialyse gegen PBS wurden die Proteine im SDS-Gel analysiert.

#### 3.4.2.3 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

FbaB spezifische polyklonale Antikörper wurden mit Hilfe der Protein-A Affinitätschromatographie aufgereinigt. Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus* mit einer spezifischen Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen der G-Klasse (IgG). Protein A hat ein Molekulargewicht von 42 kDa und weist eine hohe pH-Stabilität von pH 2-10 auf. Die Bindungsaffinität zum Fc-Teil von Antikörpern ist pH-abhängig. Nach Bindung von Antikörpern in Gegenwart neutraler oder leicht alkalischer Puffer lassen sich die Immunglobuline eluieren.

Zur Gewinnung der FbaB-spezifischen polyklonalen Antikörper wurde Kaninchen Anti-FbaB Serum verwendet. Zur Aufreinigung des Serum wurde zunächst 1g Protein A-Sepharose in 10 ml PBS aufgenommen. Nach ausführlichem Waschen der Sepharose mit PBS erfolgte die Bindung des Serums an die Matrix. Die gebundenen IgG's wurden mit 0,1M Glycin pH 3 eluiert. Jede Fraktion des Eluates (ca. 1 ml) wurde zum Neutralisieren in 100 µl 1M Phosphatpuffer aufgefangen. Die Protein-A Säule wurde anschließend mit 2M Harnstoff gewaschen und mit 1M Tris-cl pH8 regeneriert.

Die Konzentration der erhaltenen IgG Fraktionen wurde anschließend mittels Photometer bestimmt.

### 3.4.3 Quantifizierung von Proteinen

Eine Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung ist die Absorptionsmessung bei 280 nm ( $OD_{280}$ ). Als Referenz wurde die Absorption des jeweiligen Puffers gewählt. Nach Lambert-Beer ist die Proteinkonzentration [mg/ml] in einer Probe der Absorption bei 280 nm proportional. Der Proportionalitätsfaktor ist der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ , der vom Gehalt der aromatischen Aminosäuren eines Proteins abhängt (Pace *et al.*, 1995).

### 3.4.4 Kopplung von Proteinen an Latexpartikel

Um das Adhärenz- und Invasionspotential rekombinanter Proteine zu untersuchen, wurden sie nach Abspaltung des GST-Tags an Latexpartikel (LB-30, Sigma;  $\varnothing$  3  $\mu$ m; im Folgenden auch als *beads* bezeichnet) gekoppelt und in Infektionsversuchen mit humanen Zellen eingesetzt.

Für das Koppeln der Proteine an die Partikel wurden ca.  $10^8$  Latexpartikel mit PBS auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und mehrmals gewaschen. Nach Zentrifugation bei 5000 rpm wurden die *beads* über Nacht bei 4°C an 100  $\mu$ g/ml Protein gekoppelt. Die Aufbewahrung der gekoppelten Partikel erfolgte nach erneutem Waschen bei 4 °C.

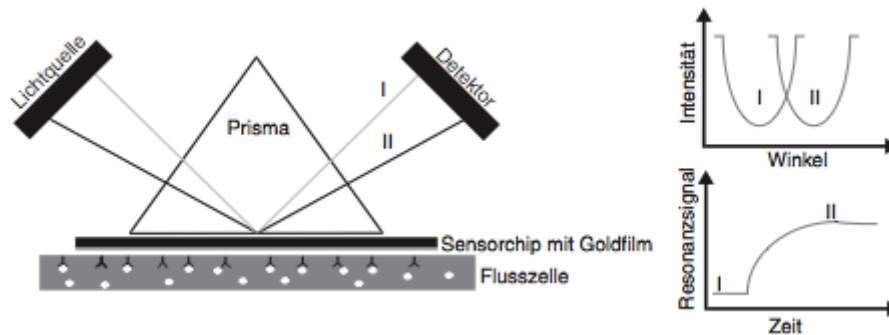
### 3.4.5 Bindungsversuche

#### 3.4.5.1 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™- Technik)

Als Oberflächenplasmonenresonanz wird die Anregung von Oberflächenplasmonen durch Licht bezeichnet. Dieses Prinzip macht sich die BIAcore™-Technik zu Nutze um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Makromolekülen qualitativ und quantitativ zu beschreiben. Dabei wird dem an einen Sensor Chip immobilisierte Ligand der zu testende Reaktionspartner (Analyt) mittels eines Fließinjektionssystems zugeführt.

Der BIAcore™ Sensor Chip besteht aus einer carboxymethylierten Dextran Matrix, die kovalent an einer Goldoberfläche gebunden ist. Der Ligand kann so wiederum kovalent über Amine oder Disulfidbrücken an die Dextran-Matrix gebunden werden. Die Anreicherung bzw. Bindung des Analyten kann nun im Durchfluss in Echtzeit und ohne Markierung gemessen werden. Dies geschieht durch polarisiertes Licht, das mittels eines Prismas auf die Goldschicht gestrahlt wird. Kommt es zu einer Bindung zwischen Ligand und Analyt, kommt

es zu kleinen Veränderungen in der Reflektion des Lichtes von der Metalloberfläche. So kann sowohl die Assoziation, als auch die Dissoziation des Analyten gemessen werden. Angegeben wird diese Interaktion als RU (*response units*), eine willkürliche Einheit, welche die Veränderung des Brechungsindex auf der Sensor Oberfläche, in Abhängigkeit von der Bindung von löslichem Analyten an seinen Liganden darstellt.



**Abbildung 3.2: Prinzip der BIAcore™-Technik** (I: Winkel ohne Ligand; II: Winkel mit Rezeptor-Ligand- Wechselwirkung) (aus BIAtechnology Handbook, 1998)

### 3.4.5.2 Bindungsversuche mit radioaktiv markierten Liganden

#### Markierung von Proteinen mit Iod

Die Proteine wurden nach der von Hunter und Greenwood (1962) beschriebenen Chloramin-T Methode, mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markiert. Bei der Chloramin-T-Methode werden Tyrosin-Reste eines Proteins iodiert. Das in wässriger Lösung zu Hypochlorsäure zersetzte Chloramin-T oxidiert  $^{125}\text{I}^-$  zu  $^{125}\text{I}^+$ .  $^{125}\text{I}^+$  setzt die anionische Form des Tyrosins zu  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin um. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei 7,5.

Die praktische Durchführung der radioaktiven Markierung wurden freundlicherweise von Dr. René Bergmann, Abteilung „Medizinische Mikrobiologie“ des HZI, übernommen.

#### Bindungsversuche mit $^{125}\text{I}$ -Fibronektin

Für die Bindungsversuche wurden 15 ml einer TSB-Übernachtskultur 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 150  $\mu\text{l}$  PBST aufgenommen. Die Suspension wurde bei 600 nm auf 10% Transmission eingestellt. Eine Transmission von 10% entspricht in etwa  $1 \times 10^9$  Bakterien je ml. 250  $\mu\text{l}$  dieser Suspension mit etwa  $2,5 \times 10^8$  Bakterien wurden in

einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 14 ng (0,001 mCi) des radioaktiven Proteins bzw. Proteinfragments gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert, zur Entfernung von ungebundenem radioaktiv markiertem Protein mit PBST gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde die vom Pellet emittierte radioaktive Strahlung im Gamma-Zähler (Wallac) gemessen. Der Versuch wurde im Zweifachansatz bzw. Dreifachansatz durchgeführt. Für die 100%-Werte wurde die gleiche Menge an radioaktiv markiertem Kollagen bzw. Fibronectin eingesetzt. Dieses wurde mit 20 µl FCS versetzt und mit 1 ml 10%iger Trichloressigsäure gefällt. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurde die vom Pellet emittierte radioaktive Strahlung bestimmt. Die prozentuale Bindungsaktivität an radioaktiv markiertem Protein(-fragment) wurde durch den Vergleich mit der gesamten im Versuch eingesetzten, radioaktiv markierten Proteinmenge ermittelt (100%-Wert).

Die praktische Durchführung der radioaktiven Bindungsversuche wurde freundlicherweise von Frau Dr. Susanne Talay, Abteilung „Medizinische Mikrobiologie“ des HZI, übernommen.

#### **3.4.6 Nachweis der Oberflächenexpression von FbaB**

##### **3.4.6.1 Markierung von Oberflächen-gebundenem Protein auf Streptokokken**

Für den Nachweis von FbaB auf der Oberfläche von Streptokokken wurden diese wie unter 3.5.5 beschrieben angezogen. Zur exponentiellen Phase wurde ein kleiner Tropfen Kultur auf einem Deckgläschen angetrocknet und mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Kokken für eine halbe Stunde mit 10% FCS in PBS geblockt. Als nächstes erfolgte eine Markierung von Oberflächen-gebundenem FbaB mittels spezifischen Anti-FbaB IgG (siehe Tabelle 3.2). Diese wurden dann wiederum mit einem zweiten, Fluoreszenz-markiertem Antikörper versehen. Bakterien, die unter dem Mikroskop fluoreszieren, exprimieren das Protein auf der Oberfläche. Als Negativkontrolle wurde zum einen ein anderer, unspezifischer Primärantikörper verwendet, zum anderen erfolgte die Inkubation ohne den ersten Antikörper, um unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers auszuschließen.

##### **3.4.6.2 FACS (*fluorescence activated cell sorting*)**

Die Stämme wurden wie zuvor beschrieben unter entsprechenden Kulturbedingungen über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurde eine frische Kultur 1:10 aus der Übernachtskultur

angesetzt. Die Stämme wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> 0,5 angezogen, 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen auf 10% Transmission in PBS eingestellt und für die Messung aliquotiert (pro Stamm 4x200 µl). Als nächstes wurden die Aliquots mit PBS+ 0,5% FCS auf 1 ml aufgefüllt und bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 4% PFA für 20- 30 min fixiert. Anschließend wurde das PFA nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wieder entfernt und das Pellet in 0,5% FCS/PBS resuspendiert.

Es folgte die Fluoreszenzmarkierung der Bakterien. Hierfür wurden die Bakterien zur Vereinzelung mit Ultraschall behandelt. Nach erneuter Zentrifugation bei 5000 rpm wurden die Kokken mit jeweils 100 µl Anti-FbaB IgG (1:200 in 0,5% FCS/PBS) für 30 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden dieselben Bakterien parallel mit 0,5% FCS/PBS inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Suspensionen mit 900 µl 0,5% FCS/PBS aufgefüllt und einer weiteren Zentrifugation unterzogen. Anschließend wurde das Bakterienpellet mit 1 ml 0,5% FCS/PBS gewaschen und mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Hierfür wurde Ziege Anti-Kaninchen IgG (Alexa Fluor® 488 konjugiert) 1:300 in 0,5% FCS/PBS verdünnt. Die zu untersuchenden Bakterienstämme und die parallelen Kontrollansätze wurden nach dem Waschschrift in jeweils 100 µl der Antikörperversdünung resuspendiert und für 30 min bei 37°C schüttelnd und in Dunkelheit inkubiert. Nach dieser Fluoreszenzmarkierung wurden die Bakterien wieder zentrifugiert (s.o.), wie beschrieben gewaschen und final in 300 µl 4% PFA resuspendiert.

Es folgte die Messung der Fluoreszenz der Bakterien im FACS. Jeder Messung wurden 10000 Ereignisse zugrunde gelegt.

## 3.5 Zellbiologische Methoden

### 3.5.1 Verwendete Zellen

Als Endothelzellen wurden für die Infektionsversuche *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) eingesetzt. Sie wurden kryokonserviert von PromoCell gekauft und standardgemäß in EGM-2 Medium, welches mit dem SupplementPack (PromoCell) supplementiert wurde, unter Zusatz von Penicillin und Streptomycin in Gelantine-beschichteten Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Zellkulturinkubator (Forma Scientific) kultiviert.

### 3.5.2 Kultivierung und Subkultivierung von HUVEC

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturschalen, wobei alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel erfolgte und alle 3-5 Tage eine Überführung der Zellen in neue Zellkulturschalen, oder in well-Platten für die Infektion.

Für die Passage wurden die Zellen zunächst mit 5 ml HEPES *Buffered Saline Solution* (HEPES-BSS) gewaschen und anschließend mittels 3 ml Trypsin/EDTA von der Platte gelöst. Das Trypsin wurde mit 7 ml EGM-2 neutralisiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert und danach in 4ml frischem vorgewärmten Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden anschließend 1 ml (ca.  $4 \times 10^5$  Zellen) auf eine neue Kulturschale zur weiteren Kultivierung ausgesät. Für eine Infektion wurden Deckgläschen in eine 4- oder 24well Platte transferiert und mit 500 µl EGM (+Supplemente und Antibiotika) bedeckt. Für eine Infektion am folgenden Tag wurden je 50 µl (ca.  $2 \times 10^4$  Zellen) der Zellsuspension zu einem Deckgläschen gegeben.

### 3.5.3 Transfektion von HUVEC

Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde von Dr. A. Nerlich aufgereinigt. Die Transfektion erfolgte mit einem Nucleofector® I (Amaxa) unter Verwendung des HUVEC Nucleofector® Kit (Amaxa). Die Zellen wurden zwei Tage vor der Transfektion passagiert und auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Es wurden nur Zellen verwendet, die am Tag der Transfektion ca. 80-90% konfluent waren. Vor der Transfektion wurden die Zellen wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben Trypsin behandelt und die Zellzahl wurde bestimmt. Sie lag im Durchschnitt bei  $1,5\text{-}2 \times 10^5$  Zellen pro 1ml. Für die Transformation eines Plasmides wurden ungefähr  $2,5 \times 10^5$  HUVEC für 10 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl der vorbereiteten Nucleofector-Lösung resuspendiert und mit 1 µg der gewünschten Plasmid-DNA versehen. Die Transfektion wurde wahlweise unter Verwendung von Programm U-01 oder A-24 durchgeführt. Unmittelbar danach wurden 500 µl vorgewärmtes Medium zum Transfektionsansatz gegeben und jeweils 300 µl der Zellsuspension in vorbereiteten Kulturgefäßen auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

transfizierte Plasmide: pEGFP-C1  
pEGFP-wtRac1  
pEGFP-N17Rac1  
pTagRFP-PX  
pTagRFP-PAK-CRIB



### 3.5.4 Prä-Inkubation von HUVEC

#### 3.5.4.1 Behandlung von HUVEC mit Inhibitoren

Es wurden verschiedene Inhibitoren verwendet, die mit der Aufnahme der Streptokokken in die Zellen interferieren sollten. Bei PP2 bspw. handelt es sich um einen Inhibitor, der spezifisch für die Src-Kinasefamilie ist. LY294002 inhibiert Kinasen der PI3K-Familie. Alle verwendeten Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Um eine Beeinflussung der Internalisierung durch das Lösungsmittel auszuschließen, wurde die Wirkung der entsprechenden DMSO-Konzentrationen auf die Aufnahme der Bakterien untersucht. In Tabelle 3.5 sind die eingesetzten Konzentrationen und die Prä-Inkubationszeiten angegeben. Die Inhibitoren wurden entsprechend der angegebenen Konzentration in Zellkulturmedium verdünnt (Tab. 3.6).

**Tabelle 3.6: Verwendete Inhibitoren für zelluläre Komponenten**

Inhibitor	Konzentration [μM]	Lösemittel	Prä-Inkubationszeit [min]
LY294002	25	DMSO	45
PP2	5	DMSO	30
Edelfosine	20	DMSO	30
Calphostin	2	DMSO	30
BAPTA-AM	25	DMSO	30
Taxol	0,01	DMSO	30

#### 3.5.4.2 BSA-Gold Behandlung von HUVEC

##### Kopplung von BSA an Gold

10 ml einer Colloidin Gold Lösung mit 15 nm großen Goldpartikel wurde mit 1,1M  $K_2CO_3$  auf pH 6,2 eingestellt. Für die Kopplung des BSA ans Gold wurde das Gold mit 100 μl BSA (1 mg/ml in PBS) für 15 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindung des BSA an Gold erfolgt dabei über van der Waals Kräfte aufgrund der positiven Ladung des Proteins

und der negativen Ladung des Goldes. Nach der Inkubation wurde die Stabilität der BSA-Gold Verbindung getestet. Dafür wurde ein 1:1 Gemisch aus 10% NaCl und der BSA-Gold Lösung hergestellt. Da es dabei zu keiner bläulichen Verfärbung kam, war der Komplex stabil. Zur Aufkonzentration der BSA-Gold Partikel wurde das Gemisch anschließend für 20 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene rote Pellet (=Gold) wurde anschließend vorsichtig mit einer Pasteurpipette in ein silikonisiertes Eppendorfgefäß überführt.

#### **Prä-Inkubation von HUVEC mit BSA-Gold**

Eine zu 70%-80% konfluente 10 cm Zellkulturschale mit HUVEC wurden wie unter 3.5.2 beschrieben trypsinisiert. Anschließend wurden in 3-wells einer 6-well Platte (Nunc) jeweils ca.  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde BSA-Gold in unterschiedlichen Mengen (125  $\mu$ l, 250  $\mu$ l und 375  $\mu$ l) direkt auf jeweils 1 well gegeben. Die Zellen wurden anschließend bis zur Aufbereitung für die Infektion am Folgetag, unter Standardbedingungen weiter kultiviert (s. 3.5.1).

#### **3.5.5 Infektionsversuche**

Die Internalisierung der Streptokokken in HUVEC wurde licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Zellen wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Am Tag der Infektion wurden die Zellen zweimal mit antibiotikafreiem EGM-2 Basalmedium gewaschen und 500  $\mu$ l frisches Medium zu den Zellen gegeben. Alle Lösungen und Medien wurden vor dem Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

Die Bakterien wurden in 7 ml TSB (mit entsprechender Antibiotikakonzentration) bei 37°C über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurde eine frische Kultur angelegt. Hierfür wurden 45 ml frisches TSB (+/- Antibiotika) 1:10 mit der Übernachtskultur versetzt und bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,4 (GBS FbaB) bzw. 0,55 (GAS M3, SGO FbaB) angezogen. Vor der Infektion wurden die Kulturen zehn Minuten bei 3000xg (Megafuge 1.0, Haereus) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde im Photometer (Novaspec II, Pharmacia) auf eine Transmission von 10% bei 600 nm eingestellt. Für den Start der Infektion wurden Gruppe A Streptokokken 1:100 in EGM-2 Basalmedium + 5%FCS verdünnt. Gruppe B Streptokokken und *S. gordonii* wurden 1:200 in EGM-2 Basalmedium + 5% FCS verdünnt. Zum Infektionsstart wurden jeweils 250  $\mu$ l der Bakterienverdünnungen zu den ausgesäten, gewaschenen Zellen gegeben.

Um den Einfluss von Fibronectin bei der FbaB-vermittelten Invasion zu untersuchen wurden FbaB exprimierende GBS und GBS WT wie beschrieben angezogen, auf 10% Transmission eingestellt und 1:200 in EGM-2 Basalmedium verdünnt. Anschließend wurde zu den Verdünnungen 2 µg/ml bzw. 50 µg/ml des 30 kDa Fibronectin-Subfragments gegeben und für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Prä-Inkubation wurde noch 5% FCS zu der Bakterienverdünnung gegeben und die Infektion mit 250 µl/well gestartet.

Die infizierten Zellen wurden im Zellkulturinkubator (Forma Scientific) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach den entsprechenden Infektionszeitpunkten wurden die Zellen zweimal mit EGM-2 Basalmedium gewaschen und anschließend fixiert.

## **3.6 Mikroskopische Arbeiten**

### **3.6.1 Elektronenmikroskopie**

#### **Rasterelektronenmikroskopie**

Die für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden nach den entsprechenden Infektionszeitpunkten zweimal mit EGM-2 Basalmedium gewaschen und anschließend in Fixierpuffer (2% Glutaraldehyd, 5% Formaldehyd in Cacodylatpuffer) fixiert. Nach mehreren Waschschritten mit TE-Puffer wurden die Proben in einer aufsteigenden Serie mit Aceton (10%, 30%, 50%, 70%, 100%) auf Eis für jeweils 15 min entwässert. Danach wurden die Proben in flüssigem CO<sub>2</sub> einer kritischen Punkttrocknung unterzogen und mit einer ca. 10 nm dicken Goldschicht bedampft. Die Proben wurden mit einem Feldemissions- Rasterelektronenmikroskop (FESEM, Gemini DSM982, Zeiss) mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV untersucht.

#### **Transmissionselektronenmikroskopie**

Infizierte HUVEC wurden nach der Infektion in Fixierpuffer (2% Glutaraldehyd, 3% Formaldehyd in Cacodylatpuffer) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit Cacodylatpuffer wurden die Zellen fixiert, für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 1% wässrigem Osmium Tetroxid kontrastiert und anschließend wieder mit Cacodylatpuffer gewaschen. Nun wurden die Zellen von den Platten geschabt und pelletiert. Es folgte die Einbettung in Kunstharz nach Spurr (Spurr 1969).

Die Präparation der Proben und die Untersuchung im Elektronenmikroskop erfolgte durch PD Dr. Manfred Rohde (Abteilung Medizinische Mikrobiologie am HZI).

### 3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass die im Präparat befindlichen fluoreszierenden Stoffe (Fluorochrome) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden. Dabei emittieren sie Licht, welches in der Regel langwelliger ist als das anregende Licht. Anregungs- und Emissionswellenlänge können so im selben Strahlengang optisch getrennt werden.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde unter anderem angewendet um das Invasionspotential von Bakterien zu bestimmen. Wie unter 3.5.5 beschrieben wurden HUVEC infiziert, fixiert und wie unter 3.6.2.2 beschrieben fluoreszenzmarkiert.

Die Auswertungen erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) mit Hilfe einer Quecksilberdampflampe und eines manuell verschiebbaren Filterschiebers. Die Fluoreszenzbilder wurden über eine Kamera (AxioCam HRc, Zeiss) mit Hilfe der Axiovision Software aufgenommen. Anschließend wurden die Bilder hinsichtlich Größe, Helligkeit und Kontrast mit dem Bildbearbeitungsprogramm „ImageJ“ konfiguriert.

#### 3.6.2.1 Konfokale Mikroskopie

Bei einem Konfokalmikroskop wird im Gegensatz zu einem konventionellen Lichtmikroskop nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern nur ein Bruchteil davon, meist ein beugungsbegrenzter Lichtfleck. Da das Präparat Punkt für Punkt abgerastert wird, entsteht hier zu keiner Zeit ein vollständiges Bild. Erst am Ende der Messung wird ein Bild konstruiert. Mit Hilfe einer Lochblende (Pinhole), die im Strahlengang des detektierten Lichtes angebracht ist, kann Licht, welches von außerhalb der aktuellen Schärfenebene kommt, blockiert werden. Damit hat das Konfokalmikroskop den Vorteil, dass die Auflösung der Bilder gegenüber einem normalen Lichtmikroskop höher ist.

Die konfokale Mikroskopie wurde eingesetzt um Zellen, die durch Transfektion fluoreszieren aufzunehmen. Transfizierte Zellen wurden am folgenden Tag wie unter 3.5.5 beschrieben, mit Streptokokken infiziert und nach entsprechender Infektionsdauer mit 3% PFA (in modifiziertem Zytoskelettpuffer [10 mM MES, pH 7.0], 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Sucrose) fixiert. Anschließend wurden gegebenenfalls zusätzliche Zellkompartimente und Bakterien fluoreszenzmarkiert. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe von Dr. Andreas Nerlich mit einem inversen LSM510 Meta Konfokalmikroskop mit Hilfe der Zen Software (Zeiss Microimaging, Jena) erstellt. Die konfokalen Bildstapel wurden mit der

Huygens Essential Software (Hilversum, Niederlande) dekonvolutiert und mit ImageJ nach linearer Kontrastanpassung in Maximum-Intensitätsprojektionen (2D Bilder) umgewandelt.

Für Zeitrafferaufnahmen wurden HUVEC wie beschrieben transfiziert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in  $\mu$ -Slides angezogen ( $\mu$ -Slide 8 well von Ibidi, München). Nach Einstellen der Bakterien wie unter 3.5.5 beschrieben, wurden die Zellen infiziert. Während der mikroskopischen Aufnahmen wurden die Slides in eine Inkubationskammer überführt um die Temperatur und den CO<sub>2</sub> Gehalt für die Zellen optimal zu halten. Zusätzlich war das Mikroskop mit einer Objektivheizung (Zeiss, Jena) ausgestattet.

Die zellulären Abläufe wurden mit Hilfe von Dr. Andreas Nerlich an einem inversen Mikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss) mit einer CCD-Kamera (Coolsnap<sub>HQ</sub>, Photometrics, Tucson, AZ) unter Einsatz einer Halogenlampe aufgenommen. Die Steuerung des Mikroskops erfolgte mit der Metamorph Software (Molecular Devices, Downingtown, PA). Die Aufnahmen wurden anschließend mit Huygens Essential Software (Hilversum, Niederlande) dekonvolutiert und mit ImageJ weiter bearbeitet.

#### **3.6.2.2 Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen**

##### **3.6.2.2.1 Differentielle Fluoreszenzfärbung von Streptokokken und Latexpartikel**

Nachdem durch dreimaliges Waschen in 1xPBS die Fixierlösung von den Zellen entfernt wurde, erfolgte eine 30minütige Inkubation mit dem Blocking-Puffer (10% FCS/PBS) um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Nun wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Markierung extrazellulärer Streptokokken mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 3.2) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen erfolgte als nächstes die einstündige Inkubation mit dem ersten Sekundär-Antikörper (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, siehe Tabelle 3.2). In den bislang genannten Färbeschritten werden nur extrazelluläre Bakterien/Partikel markiert, da die Antikörper nicht durch die intakte Zellmembran der HUVEC gelangen können. Um auch intrazelluläre Bakterien Fluoreszenz-markieren zu können, erfolgte als nächstes eine Permeabilisierung der Zellen. Hierfür wurden die Zellen 5 Minuten lang 0,1%-Triton X-100 in PBS ausgesetzt und anschließend dreimal gewaschen. Für die Markierung der extra- und intrazellulären Bakterien erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, an welchen im Anschluss ein Sekundär-Antikörper mit einem anderen Fluorochrom (Alexa Fluor<sup>®</sup> 568, siehe Tabelle 3.2) zur Bindung eingesetzt wurde.

Schlussendlich wurden die Coverslips umgekehrt auf jeweils 2 µl ProLong Gold® fixiert, mit Nagellack versiegelt und bis zur Analyse bei 4°C dunkel gelagert.

#### **3.6.2.2.2 Fluoreszenzfärbung von Streptokokken und Zellkomponenten**

Für diese Immunfluoreszenzfärbungen wurden die fixierten Zellen zunächst mit 0,1% Triton X-100 in PBS wie oben beschrieben permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte für 20 Minuten eine Inkubation mit Blocking-Puffer. Die Proben wurden danach wie oben beschrieben mit dem primären Antikörper inkubiert. Die weitere Behandlung der Präparate erfolgte, wie im Folgenden beschrieben, je nach Nachweis der Zellbestandteile.

Dazu wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt und die Präparate zum Schluss wie in 3.6.2.2.1 beschrieben versiegelt und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

#### **Färbung von F-Aktin**

Zur Färbung von filamentösem Aktin wurde fluoreszenzmarkiertes (Alexa Fluor® 488) Phalloidin benutzt. Dies ist ein Toxin eines Knollenblätterpilzes, welches sich seitlich an filamentöses Aktin anlagert und dadurch die Depolymerisierung von Aktin verhindert.

Nachdem der primäre, gegen die Streptokokken gerichtete Antikörper durch dreimaliges Waschen in 1x PBS von den Präparaten entfernt wurde, erfolgte eine Inkubation mit dem, sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG, 1:300 in Blocking-Puffer). Nach 15 Minuten wurden zu diesem Ansatz 20 µl des fluoreszenzmarkierten Phalloidins (siehe Tabelle 3.2) gegeben und für weitere 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Präparate nach dem Waschen wieder fixiert und versiegelt.

#### **Färbung von lysosomalem Lamp1**

Lamp-1 (auch bekannt als CD107a) ist eines der häufigsten Membranglykoproteine in Lysosomen. Da es ausschließlich in späten Endosomen und in Lysosomen zu finden ist, stellt es ein Markerprotein für späte Endosomen/Lysosomen dar. Es kann somit in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden um beispielsweise eine Kolokalisation von Streptokokken mit späten Endosomen/Lysosomen bestimmen zu können und somit Aussagen darüber machen zu können, in welchem Kompartiment sich aufgenommene Bakterien/Partikel befinden.

Dazu wurde zunächst nach Permeabilisierung mit Triton-X-100 eine, wie oben beschriebene, Fluoreszenzmarkierung der Streptokokken mit Alexa Fluor®-568 durchgeführt. Als nächstes erfolgte eine einstündige Inkubation der Präparate mit Maus Anti-human Lamp-1 Antikörper (CD107A; 1:50 in Blocking-Puffer). Nach dreimaligem Waschen wurden dann die Lysosomen

mittels eines zweiten Antikörpers (Alexa Fluor®-488 Kaninchen Anti-Maus) fluoreszenzmarkiert und die Deckgläschen wie oben beschrieben zur Analyse und Lagerung präpariert.

#### **Färbung von endosomalem EEA1**

Die Vorgehensweise bei der parallelen Fluoreszenzmarkierung von Endosomen und Bakterien/*beads* gleicht der Färbung von lysosomalem Lamp1. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Methode dient 0,1% Saponin/PBS als Grundlage für alle Wasch- und Inkubationsschritte. Saponin ist wie Triton-X100 ein Tensid. Es macht die Zellmembran jedoch nur kurzzeitig durchlässig für z.B. Antikörper, weshalb alle Schritte in diesem Detergenz durchgeführt werden. Die Dauer der Inkubationszeiten sind gemäß oberer Lamp-1 Färbung. Die Färbung beginnt mit einem 30 minütigen Blockschrift um ungesättigte Bindungsstellen abzudecken. Als nächstes folgte die Inkubation mit Maus Anti-EEA1 IgG für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach ausgiebigem Waschen wurden dann die primären Antikörper mit einem sekundären Antikörper fluoreszenzmarkiert. Als nächstes erfolgte wie oben beschrieben die Färbung der Streptokokken oder Latex-Partikel. Zur weiteren Analyse wurden die Präparate wie oben beschrieben behandelt und bei 4°C gelagert.

#### **3.6.2.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Grafik- und Statistiksoftware GraphPad Prism®, Ausgabe 5. Die Signifikanz der Daten wurde mit dem *students t-test* bzw. dem Tukey post hoc Test (ANOVA) bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Konstruktion eines bakteriellen Systems zur heterologen Expression von FbaB und einer *fbaB* knock out Mutante

Zur detaillierten funktionellen Analyse von FbaB sollte einerseits das *fbaB* Gen im Ausgangsstamm GAS M3 A60 inaktiviert werden, sodass es zu keiner Expression von FbaB kommt. Weiterhin sollte ein bakterielles System entwickelt werden, welches keine endogenen Faktoren exprimiert, die mit Endothelzellen interagieren und welches FbaB heterolog auf der Oberfläche exprimiert. So ist man in der Lage, entsprechende Funktionen direkt auf das Protein zurückführen zu können.

#### 4.1.1 Konstruktion eines bakteriellen Systems zur heterologen Expression von FbaB

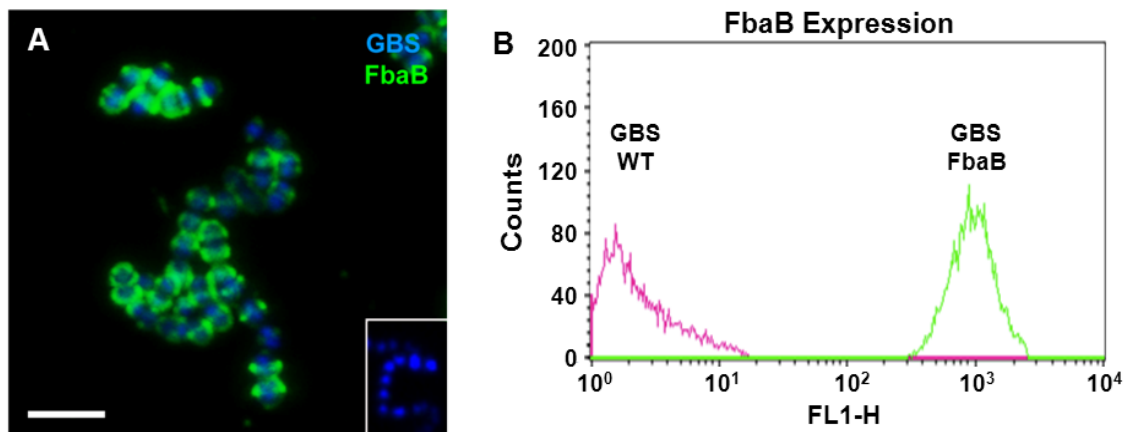
Als Voraussetzung für die heterologe Expression durfte der Modellorganismus selber nicht in der Lage sein, in humane Endothelzellen zu invadieren. Er sollte also für diesen menschlichen Zelltyp apathogen sein. *Streptococcus gordonii* und *Streptococcus agalactiae* erwiesen sich in Vorversuchen als geeignete Kandidaten. Beides sind Gram-positive Bakterien, die als Kommensale im Menschen vorkommen können und sich in Vorversuchen mit humanen Endothelzellen als nicht invasiv erwiesen. Zur optimalen Expression wurde der Vektor pDCerm ausgewählt, da bereits eine Vielzahl von Virulenzfaktoren aus pathogenen Gram-positiven Kokken erfolgreich in diesem Vektor zur Expression gebracht wurden (Zinkernagel 2008).

Für eine gerichtete heterologe Expression von FbaB auf der Oberfläche von *S. gordonii* und *S. agalactiae* wurde zunächst das gesamte *fbaB* Gen mitsamt Signalsequenz und Membrananker aus dem Ausgangsstamm A60, wie unter 3.3.2.1. beschrieben, amplifiziert und anschließend in den Vektor pDCerm kloniert. Nach erfolgreicher Transformation in *E. coli* und anschließender Plasmidisolierung, wurde der neu entstandende Vektor pDCfbaB, wie unter 3.3.5 beschrieben, in die Stämme *S. gordonii* GP1221 und *S. agalactiae* transformiert. Die entstandenen Stämme tragen die Bezeichnung *S. gordonii* FbaB (SGO FbaB) und *S. agalactiae* FbaB (GBS FbaB).

Positive Klone wurden zunächst über PCR ermittelt. Anschließend wurden diese dann hinsichtlich ihrer der Oberflächenexpression von FbaB untersucht. Mittels spezifischer Anti-FbaB IgG's (Diplomarbeit S. Amelung) und Sekundärantikörper konnte das Protein auf der



Oberfläche der Bakterien in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (Abb. 4.1 A). Diese Antikörper wurden weiterhin zur quantitativen Bestimmung der FbaB Expression mittels FACS-Analyse eingesetzt (Abb. 4.1 B). Das von GBS FbaB emittierte Signal war um das 1000-fache erhöht im Vergleich zum GBS WT. Dies weist auf eine signifikant hohe Oberflächenexpression von FbaB im Modellorganismus hin.



**Abbildung 4.1: Heterologe Expression von FbaB auf der Oberfläche von *Streptococcus agalactiae*.** **A:** Markierung von Oberflächen-gebundenem FbaB (grün) auf GBS FbaB. Die bakterielle DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Im kleinen Kästchen ist GBS WT dargestellt, welcher kein FbaB exprimiert. Maßstabsbalken entspricht 5 µm. **B:** FACS Analyse zur Messung der Oberflächenexpression von FbaB auf GBS WT (rot) und GBS FbaB (grün).

Da es sich bei FbaB um ein fibronectinbindendes Protein handelt, konnte die erfolgreiche Expression auf der Oberfläche der Bakterien auch indirekt, über die Bindung von Fibronectin, bestätigt werden. Dazu wurden die Bakterien mit löslichem, radioaktiv markiertem Fibronectin inkubiert. Anschließend wurde mit einem Gamma-Counter an Bakterien gebundenes Fibronectin wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.4 B dargestellt ist, bindet GBS FbaB zu 25% lösliches Fibronectin, während der GBS Wildtypstamm nahezu kein lösliches Fibronectin bindet.



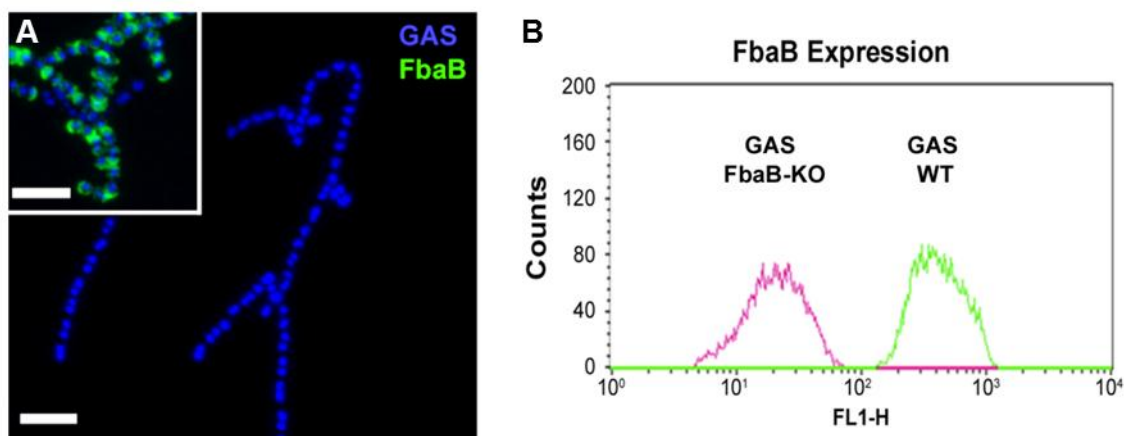
**Abbildung 4.2: Expression von FbaB auf der Oberfläche von *S. gordonii*.** FbaB wurde mit Kaninchen Anti-FbaB IgG und Alexa<sup>®</sup> Fluor 488 grün markiert.

So konnte mit verschiedenen Methoden die heterologe Expression von FbaB auf der Oberfläche von *S. agalactiae* nachgewiesen werden (Abb. 4.1). Auch im Falle des rekombinanten Stammes SGO FbaB, konnte die Oberflächenexpression (Abb. 4.2) mittels Fluoreszenzmikroskopie demonstriert werden. So war es möglich in den folgenden Bindungs- und Zellinfektionsversuchen gezielt die Funktion von FbaB zu untersuchen.

#### 4.1.2 Generierung einer *fbaB* knock out Mutante

Terao *et al.* (2002) konnten mit Hilfe einer *fbaB*-Mutante, die ein deutlich verringertes Adhäsionspotenzial aufwies zeigen, dass FbaB die Adhäsion an Epithelzellen vermittelt. Um den direkten, oder indirekten Einfluss von FbaB auf die Invasion in humane Endothelzellen untersuchen zu können, sollte als nächstes das *fbaB*-Gen in dem GAS M3 Stamm A60 ausgeschaltet werden.

Die Mutante wurde generiert, indem durch heterologe Rekombination das *fbaB*-Gen durch eine Chloramphenicol Acetyltransferase (*cat*) Antibiotikaresistenzgenkassette ausgetauscht wurde. Die Konstruktion der Mutante ist unter 3.3.6 beschrieben und trägt die Bezeichnung A60 $\Delta$ *fbaB*.



**Abbildung 4.3: Untersuchung von A60  $\Delta$ *fbaB* hinsichtlich der Expression von FbaB.** **A:** Fluoreszenznachweis von Oberflächen-gebundenem FbaB. A60 $\Delta$ *fbaB* zeigt im Gegensatz zum Wildtyp (kleines Kästchen) keine Expression von FbaB (grün). Hier ist nur bakterielle DNA sichtbar (blau). Maßstabsbalken entsprechen 5  $\mu$ m. **B:** FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von FbaB auf A60 WT (grün) und A60 $\Delta$ *fbaB* (rot)

Zur Überprüfung der Expression von FbaB auf der Oberfläche wurden die Bakterien wie unter 3.6.2.2.1 beschrieben behandelt und gefärbt. Anschließend wurde die Expression von

FbaB am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, konnte bei der Mutante keine spezifische Bindung des Antikörpers nachgewiesen werden (Abb 4.3 A), während der WT A60 Stamm eine deutlich grüne Färbung aufgrund der FbaB Expression zeigt (Abb. 4.3 A). Um die FbaB-Expression zu quantifizieren, wurden sowohl der Wildtypstamm, als auch die Mutante bis zu einer optischen Dichte von 0,5 (späte exponentielle Phase) angezogen. Anschließend wurde eine Messung der Oberflächenexpression von FbaB mittels einer FACS-Analyse durchgeführt. Hier konnte für die Mutante eine 20-fach geringere Expression von FbaB verzeichnet werden, als für den Wildtypstamm (Abb. 4.3 B).

Der Verlust des FbaB-Proteins bestätigte so die erfolgreiche Deletion des *fbaB*-Gens aus dem Chromosom von M3 GAS A60.

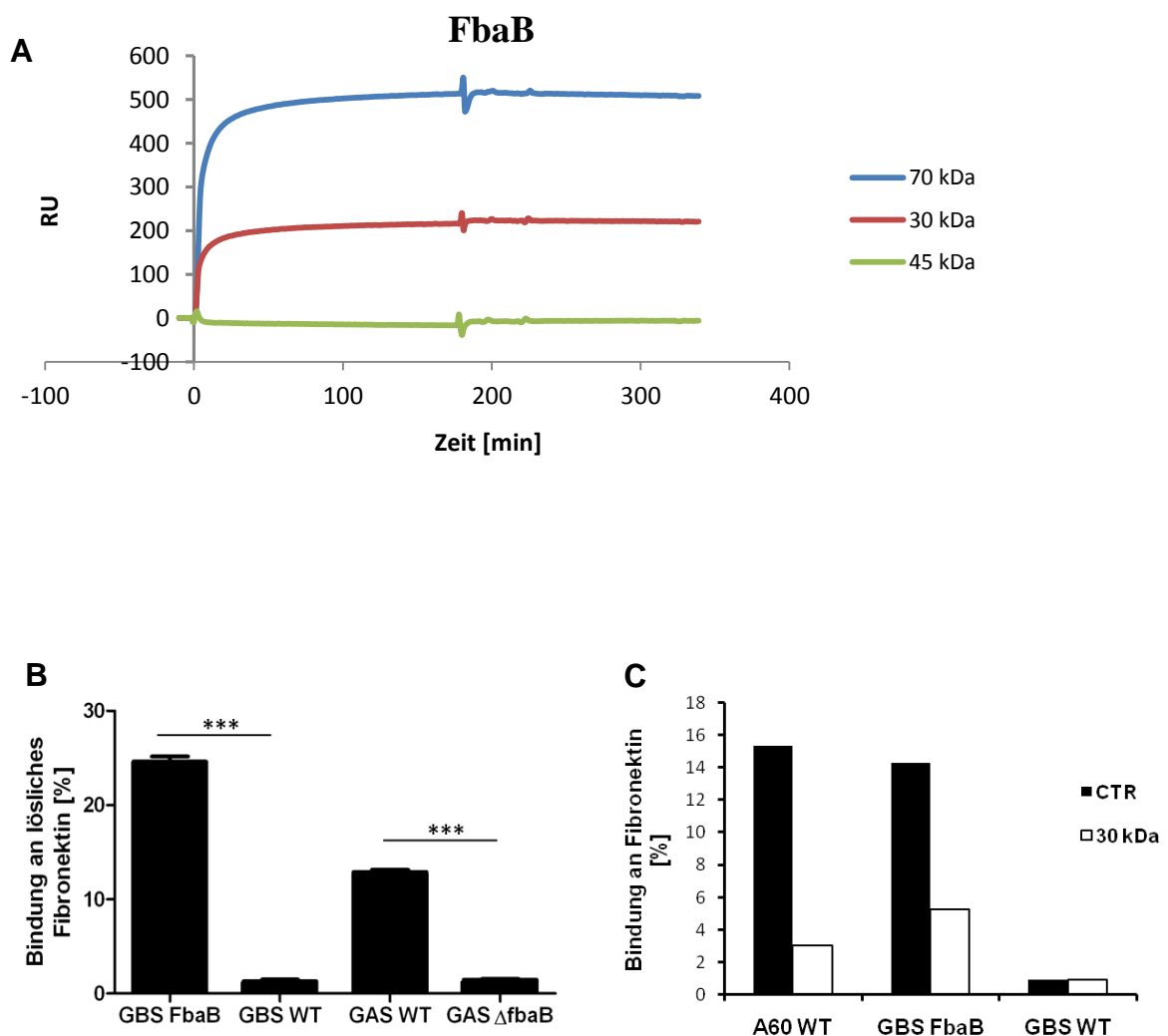
### 4.2 FbaB bindet an Proteine der extrazellulären Matrix

FbaB ist als Fibronectin-bindendes Protein von Gruppe A Streptokokken beschrieben. Die Domäne von Fibronectin (Fn), an welche FbaB bindet, ist jedoch nicht bekannt. Zudem weist die Struktur von FbaB einige Integrin-Bindungsstellen auf, sowie Homologien zu Domänen Kollagen-bindender Proteine anderer Gram-positiver Bakterien.

FbaB besitzt, wie viele andere Fibronectin-bindenden Proteine aus Gram-positiven Kokken, einen repetitiven C-Terminus, der sich im Fall des FbaB-Proteins des Stammes A60 aus 6 sogenannten Fn-bindenden *repeats* zusammensetzt. Für das Sfbl-Protein konnte gezeigt werden, dass diese repetitive Region an das 30 kDa N-terminale Fragment des Fibronectin bindet. Des Weiteren besitzt Sfbl ein stromaufwärts angrenzendes, nicht repetitives Modul, den Fibronectin-bindenden *spacer* (Talay 2000), der an die 45 kDa Gelatin-bindende Domäne des Fibronectin bindet. Da FbaB homologe *repeats* zum Sfbl-Protein aufweist, jedoch keine zum *spacer* homologe Region besitzt, wurde angenommen, dass FbaB an das 30 kDa N-terminale Fn-Modul bindet. Dies sollte im Folgenden experimentell bestätigt werden.

#### 4.2.1 FbaB bindet über *fibronectin-binding repeats* an das 30 kDa Fragment des Fibronektins

In einem ersten Versuch sollte die Bindung von FbaB an verschiedene Fibronectin-Subfragmente untersucht werden. Dazu wurden die Fibronectin-Subfragmente (70 kDa, 30 kDa und 45 kDa) an eine Goldoberfläche gekoppelt und Interaktion mittels Oberflächenplasmonresonanz gemessen. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, die Bindung von FbaB an das 30 kDa Fragment des Fibronektins nachzuweisen und eine Bindung an das 45 kDa Fragment auszuschließen (siehe Abbildung 4.4 A).



**Abbildung 4.4: Bindung von FbaB an das 30 kDa Fibronektin Fragment.** **A:** Bindung von FbaB (Analyt) an die Fibronectin Subfragmente (Liganden), gemessen mittels Oberflächenplasmonresonanz. **B:** Bindung von FbaB exprimierenden Bakterien an radioaktiv markiertes lösliches Fibronektin **C:** Inhibition der Fibronektinbindung durch Präinkubation der Bakterien mit dem 30 kDa Fibronektin Subfragment.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FbaB nicht nur als rekombinantes Protein, sondern auch im lebenden System die Eigenschaft zur Bindung an lösliches Fibronektin vermittelt. Hierzu wurden die heterolog FbaB-exprimierenden *S. gordonii* und *S. agalactiae* Stämme mit radioaktiv markiertem Fibronektin inkubiert. Anschließend konnte mit einem Gamma-Counter gebundenes Fibronektin nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.4 B). Hierbei zeigte sich bei allen FbaB-exprimierenden Stämmen eine deutliche Bindung von Fibronektin. *S. gordonii* und *S. agalactiae* Wildtypstämme dienten als Negativkontrolle und zeigten, wie erwartet, keine Bindung. Auch die FbaB *knock out* Mutante zeigt im Vergleich zum GAS A60 Wildtyp eine deutlich verringerte Bindung an das Fibronektin. Dies bestätigt die Ergebnisse, die mittels Plasmonresonanz mit rekombinatem Protein gewonnen wurden.

Um weitere Bindungsstellen auf dem restlichen, 120 kDa umfassenden Fn-Molekül ausschließen zu können, wurde ein indirekter Ansatz gewählt, da sich das 120 kDa Fragment schlecht in löslicher Form darstellen lässt. Unter der Prämisse, dass das 30 kDa N-terminale Fragment die einzige Bindungsdomäne darstellt, sollte nach Inkubation mit dem unmarkiertem 30 kDa Fragment die Bindung von markiertem Gesamt-Fibronektin inhibierbar sein. Durch das 30 kDa Fragment lässt sich die Bindung von FbaB an Gesamt-Fibronektin hemmen (Abb. 4.4 C).

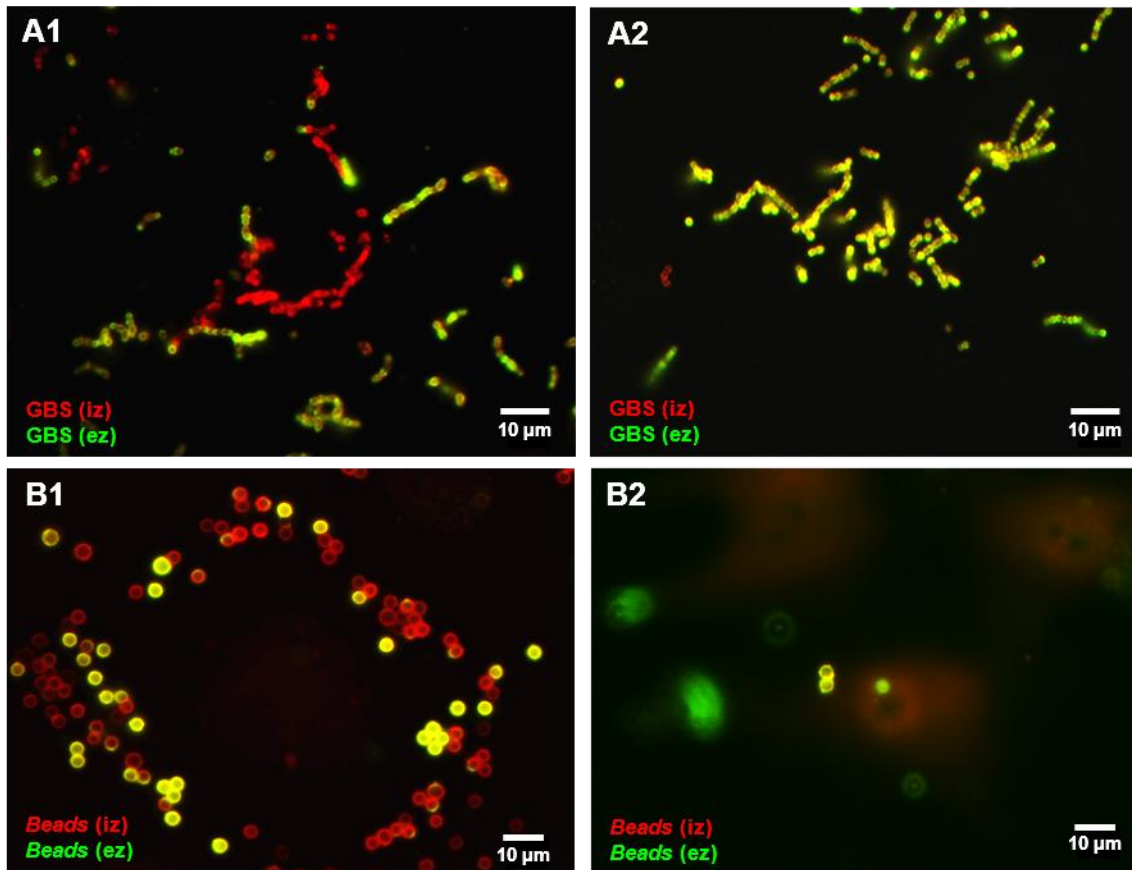
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Bindung von FbaB an Fibronektin über das 30 kDa Fibronektin-Subfragment stattfindet.

### 4.3 FbaB ist ein potentes Invasin auf Endothelzellen

#### 4.3.1 FbaB vermittelt Invasion in Endothelzellen

Es ist bekannt, dass Gruppe A Streptokokken des Serotyps M3 ein starkes Potential haben Endothelzellen zu invadieren (Nerlich 2009) und anschließend zu transmigrieren (Talay 2010, in Revision). Sie adhärieren und invadieren auf der luminalen Seite der Zelle und werden auf der basolateralen Seite exozytiert. Allerdings sind die für die Invasion in Endothelzellen verantwortlichen Adhäsine und Invasine in M3 *S. pyogenes* bislang unidentifiziert. Es gibt auf der Oberfläche der Gruppe A Streptokokken bestimmte Faktoren, die das Potential haben könnten, die Invasion zu vermitteln. Allen voran die Gruppe der Fibronektin-bindenden Proteine, deren Funktion als Adhäsine/Invasine für eine Vielzahl von bakteriellen Spezies gezeigt werden konnte. Damit ist FbaB, als Fibronektin-bindendes Protein von M3 GAS, ein vielversprechender Kandidat bei der Suche nach dem Invasin für Endothelzellen.

Zur Untersuchung des Invasionspotentials von FbaB auf Endothelzellen dienten die konstruierten Stämme *S. agalactiae*-FbaB, die FbaB-Mutante A60Δ*fbaB*, sowie mit FbaB gekoppelte Polystyren (Latex)-Partikel (FbaB *beads*). Im *in vitro* Infektionsversuch wurden primäre Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur (HUVEC) mit diesen Stämmen infiziert, sowie mit FbaB *beads* koinkubiert. Nach dem Fixieren wurden *beads* und Bakterien mit spezifischen Antikörpern markiert und extrazelluläre Bakterien mit einem grün-fluoreszierenden und intrazelluläre Bakterien mit einem rot-fluoreszierenden Sekundär-Antikörper sichtbar gemacht. Anschließend wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen gemacht und die Zahl der intrazellulären Bakterien und *beads* bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils die genetisch unveränderten Wildtypstämme, sowie GST-gekoppelte *beads*.

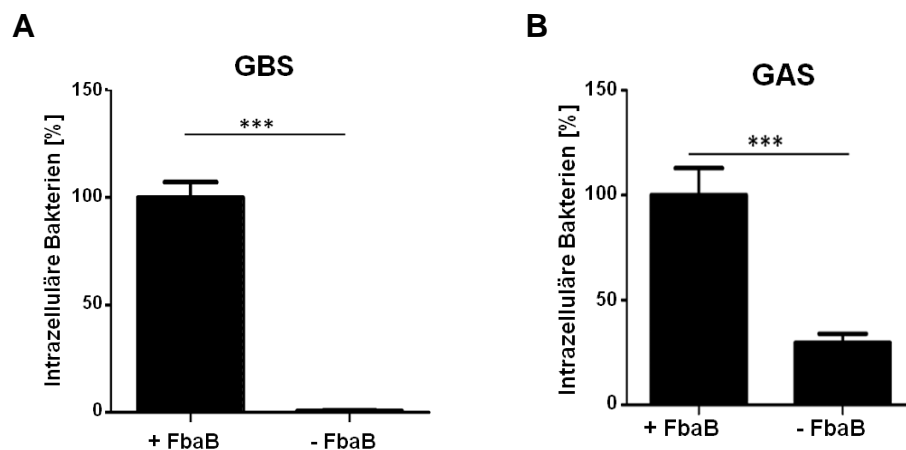


**Abbildung 4.5: Darstellung des von FbaB-vermittelten Invasionspotential auf humanen Endothelzellen.** **A:** HUVEC wurden für 2 Stunden mit GBS FbaB (1) und GBS WT (2) infiziert. Extrazelluläre Bakterien sind grün/gelb dargestellt, intrazelluläre Bakterien rot. **B:** Zur Kontrolle wurden HUVEC für 1 Stunde mit FbaB *beads* (1) und GST-gekoppelten *beads* (2) infiziert. Extrazelluläre *beads* sind grün/gelb (ez), intrazelluläre *beads* rot dargestellt. (iz)

Es zeigte sich, dass der nicht-invasive *S. agalactiae* Stamm durch die Expression des Faktors FbaB ein um 98% höheres Invasionspotential auf HUVEC erlangt (Abb. 4.6 A). Auch Latex-beads werden ohne FbaB auf der Oberfläche nicht in HUVEC aufgenommen. Allein der Faktor FbaB, gekoppelt auf der Oberfläche, bewirkt eine effiziente Aufnahme der Partikel (Abb. 4.5 B1). Zur Kontrolle wurden Latex-Partikel mit GST gekoppelt. Diese zeigten eine um ca. 85% verringerte Aufnahme in HUVEC (Daten nicht gezeigt).

Auch die isogene Mutante (A60ΔfbaB) des Stammes GAS A60 zeigte ein signifikant (auf ca. 30%) verringertes Invasionspotential (Abb. 4.6 B).

Diese Ergebnisse beweisen erstmals, dass FbaB ein potentes Invasin für humane Endothelzellen darstellt. Des Weiteren zeigen die Daten, dass FbaB allein für eine effiziente Invasion in Endothelzellen ausreicht, und dass unter diesen *in vitro* Versuchsbedingungen FbaB hauptverantwortlich für die Endothelinvasion der M3 Gruppe A Streptokokken ist.

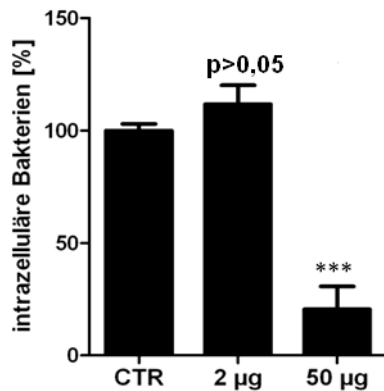


**Abbildung 4.6: Quantifizierung des FbaB-vermittelten Invasionspotentials in humane Endothelzellen. A:** Invasion von GBS WT und GBS FbaB **B:** Invasionspotential von GAS A60 WT und der GAS A60 *fbaB-knock out*. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD eines repräsentativen von 4 unabhängigen Experimenten (\*\*\*) $p \leq 0,0001$ .

#### 4.3.2 Die FbaB vermittelte Aufnahme erfolgt über Fibronectin

Als nächstes stellte sich die Frage, welche Wirtskomponenten für die FbaB-vermittelte Invasion essentiell sind. FbaB ist als Fibronectin-bindendes Protein beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Interaktion genauer biochemisch analysiert werden. Es lag also die Vermutung nahe, das Fibronectin, wie bereits für SfbI- und M1-Protein gezeigt,

bei der FbaB-vermittelten Invasion eine Rolle als Brückenmolekül spielen könnte. Um dies zu bestätigen, wurden weitere Infektionsversuche mit HUVEC durchgeführt. Mit dem Ziel, alle Fibronectin-Bindungsstellen auf der Bakterienoberfläche mit dem 30 kDa Fibronectin Fragment abzusättigen, welches keine  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-bindende Domäne besitzt, wurden die Bakterien mit diesem Fn-Fragment prä-inkubiert. Nach der Präinkubation der Bakterien erfolgte wieder eine zweistündige Infektion der Endothelzellen. Nach anschließender Fluoreszenzmarkierung von intra- und extrazellulären Bakterien wurde die Zahl der intrazellulären Bakterien bestimmt. Als Kontrolle dienten Bakterien, die statt mit dem 30 kDa Fn-Fragment mit PBS prä-inkubiert wurden.



**Abbildung 4.7: Fibronectin-abhängigkeit bei der FbaB-vermittelten Invasion in HUVEC.** Eine Präinkubation der Bakterien mit 2 µg/ml und 50 µg/ml 30 kDa Fibronectin führt zu einer verringerten Invasionsfähigkeit von GBS FbaB. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD eines repräsentativen von 3 unabhängigen Experimenten (\*\*\*p<0,0005)

In Abbildung 4.7 ist zu sehen, dass das 30 kDa Fibronectin-Subfragment bei hoher Konzentration die Invasion von GBS FbaB signifikant hemmt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei einer Präinkubation der Bakterien mit 50 µg/ml des Fibronectin-Subfragmentes eine um ca. 64% verringerte Invasionsrate der Bakterien. Dies deutet auf eine Beteiligung des Fibronectins als Brückenmolekül bei der FbaB-vermittelten Invasion hin. Zur abschließenden Klärung dieser Frage sind jedoch noch weitere Versuche bspw. mit Antikörpern, die die Bindung von Fibronectin an die entsprechenden Integrine blockieren, notwendig.



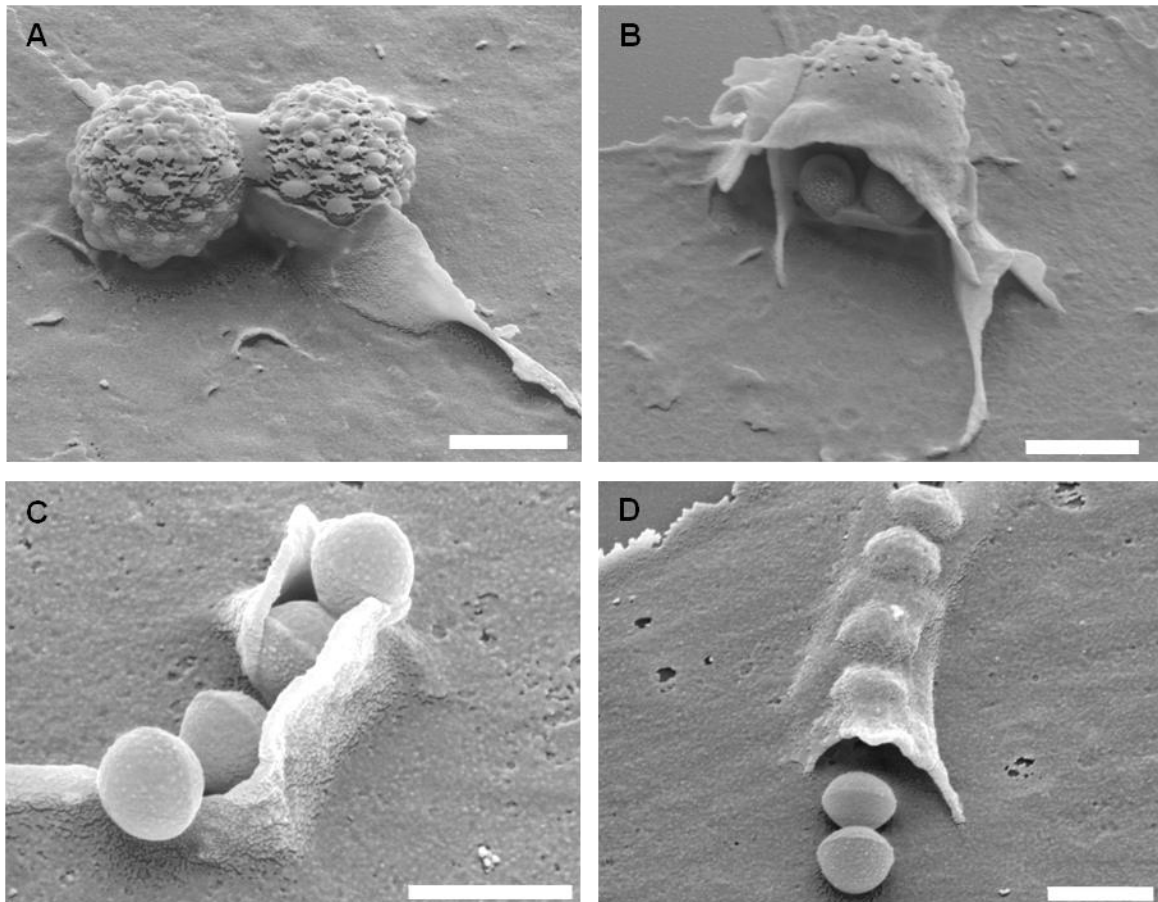
## 4.4 FbaB vermittelt F-Aktin abhängige Aufnahme über den *zipper* Mechanismus

Nach Adhäsion von *S. pyogenes* M3 an Endothelzellen erfolgt in kürzester Zeit die Internalisierung der Bakterien in die Zelle (Nerlich *et al.*, 2009). Für die Aufnahme der Bakterien werden Membranausstülpungen (sogenannte Protrusionen) gebildet, die die Bakterien umschließen und somit aufnehmen. Die Bildung von Protrusionen ist ein Prozess, der auch der Fortbewegung der Zellen zugrunde liegt. In den hierfür gebildeten Lamellipodien kommt es zu einer Polymerisation der Aktinfilamente. Durch Fluoreszenzmarkierung des filamentösen Aktins (F-Aktin) lässt sich diese Umorganisation des Aktinzytoskeletts sichtbar machen.

### 4.4.1 Bildung von Membranausstülpungen und Aufnahme über *zipper*-Mechanismus

In den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit wurde FbaB als Fibronektin-bindendes Invasin von M3 *S. pyogenes* identifiziert. Sfbl-exprimierende Streptokokken werden über Membraneinstülpungen (sogenannten Invaginationen) in Caveosomen aufgenommen, ein Prozess der ausschließlich vom Sfbl-Protein vermittelt wird. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aufnahme von M3 *S. pyogenes* über den *zipper* Mechanismus. Um zu bestimmen, welcher Aufnahmemechanismus durch FbaB vermittelt wird, wurden HUVEC mit GBS FbaB und FbaB gekoppelten *beads* infiziert, anschließend fixiert und für die Elektronenmikroskopie aufbereitet.

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.8) sind sowohl im Falle der Latexpartikel, als auch für GBS FbaB, Membranausstülpungen sichtbar. Da diese Protrusionen sich eng über die *beads* oder Bakterien stülpen, kann man von einem *zipper* Mechanismus sprechen. Der durch FbaB ausgelöste Aufnahmemodus unterscheidet sich demnach morphologisch stark von dem des Sfbl-Proteins.



**Abbildung 4.8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der von FbaB vermittelten Internalisierung in HUVEC.** A/B: Aufnahme von FbaB gekoppelten Latexpartikeln. A zeigt den Beginn der Aufnahme, während in B die Membran die Partikel fast vollständig umgibt und die Aufnahme deutlich voran geschritten ist. (Maßstabsbalken entsprechen 2µm) C/D: Aufnahme von GBS FbaB. In C ist der Beginn der Bildung von Membranprotrusionen zu sehen, während in D die Kette schon fast vollständig aufgenommen ist. (Maßstabsbalken entsprechen 1µm)

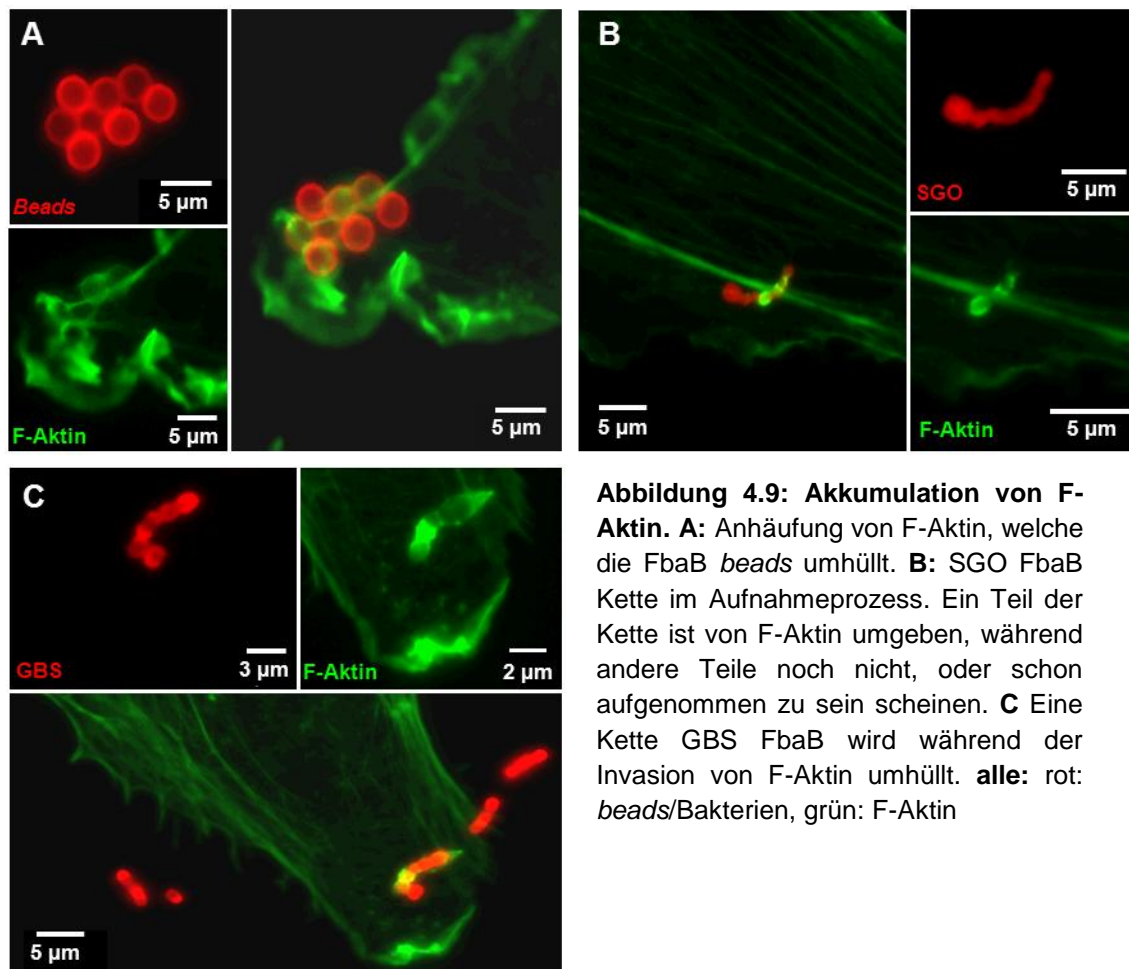
#### 4.4.2 F-Aktin Akkumulation

Der Ausbildung von Membranprotrusion liegt innerhalb der Zelle eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts zugrunde. Für M3 GAS konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktinorganisation bei dem Aufnahmeprozess in die Zelle eine Rolle spielt. Während der Ausstülpung der Membran und dem Umschließen der Bakterien ließ sich eine gleichzeitige Akkumulation von F-Aktin an dieser Stelle beobachten (Nerlich 2009).

Im Falle der FbaB vermittelten Aufnahme ließen sich mittels Elektronenmikroskopie Membranprotrusionen nachweisen. Es stellte sich die Frage, ob dieser beobachtete Prozess mit der Akkumulation von F-Aktin einhergeht.

Dafür wurden HUVEC mit SGO FbaB, GBS FbaB und FbaB-*beads* infiziert und nach 30 bzw. 60 Minuten fixiert. Anschließend wurde das F-Aktin der Zellen mit grün-fluoreszierendem Phalloidin markiert. Bakterien bzw. *beads* wurden mit rot-fluoreszierenden spezifischen Antikörpern gefärbt.

In Abbildung 4.9 ist deutlich eine Akkumulation von F-Aktin in der Umgebung von Bakterien, bzw. *beads* zu beobachten. Eine ähnliche Akkumulation ist in Abb. 4.9 A und B auch im Randbereich der Zellen zu sehen. Sie deutet auf Lamellipodien hin, wie sie z.B. bei gerichteten Bewegungsvorgängen der Zelle zu finden sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass FbaB nach Zellkontakt die Polymerisation von F-Aktin in der Zelle induziert.



**Abbildung 4.9: Akkumulation von F-Aktin.** **A:** Anhäufung von F-Aktin, welche die FbaB *beads* umhüllt. **B:** SGO FbaB Kette im Aufnahmeprozess. Ein Teil der Kette ist von F-Aktin umgeben, während andere Teile noch nicht, oder schon aufgenommen zu sein scheinen. **C** Eine Kette GBS FbaB wird während der Invasion von F-Aktin umhüllt. **alle:** rot: *beads*/Bakterien, grün: F-Aktin

## 4.5. FbaB vermittelt den klassischen endocytischen Weg

Sind Bakterien erst einmal in die Zelle gelangt, ist es ihr Ziel dort zu überleben, oder die Zelle auf schnellst möglichem Wege wieder zu verlassen. Es konnte gezeigt werden, dass *S. pyogenes* vom Serotyp M3 die Endothelzelle über den klassischen endozytischen Weg passiert (Talay 2010, in Revision). Nachdem die Bakterien durch Membranprotrusionen aufgenommen werden, fusionieren die entstandenen Phagosomen zunächst mit Endosomen zum Phagoendosomen. Diese fusionieren dann mit den Lysosomen zu terminalen Phagolysosomen. Anstatt dort jedoch sukzessiv abgetötet zu werden, entkommen die Streptokokken durch lysosomale Exozytose. *S. pyogenes* M3 wird so innerhalb der Zelle durch Zellkompartimente transportiert und an der basolateralen Seite wieder entlassen (Talay 2010, in Revision).

Der endozytische Weg des Ursprungsstamms von FbaB ist also bekannt. Unbekannt ist jedoch auch hier der bakterielle Faktor, der diesen Prozess auslöst. Im Folgenden sollte deshalb mit Hilfe der FbaB exprimierenden rekombinanten Stämme untersucht werden, welchen intrazellulären Pfad FbaB vermittelt.

### 4.5.1 FbaB vermittelt die Aufnahme in frühe Endosomen

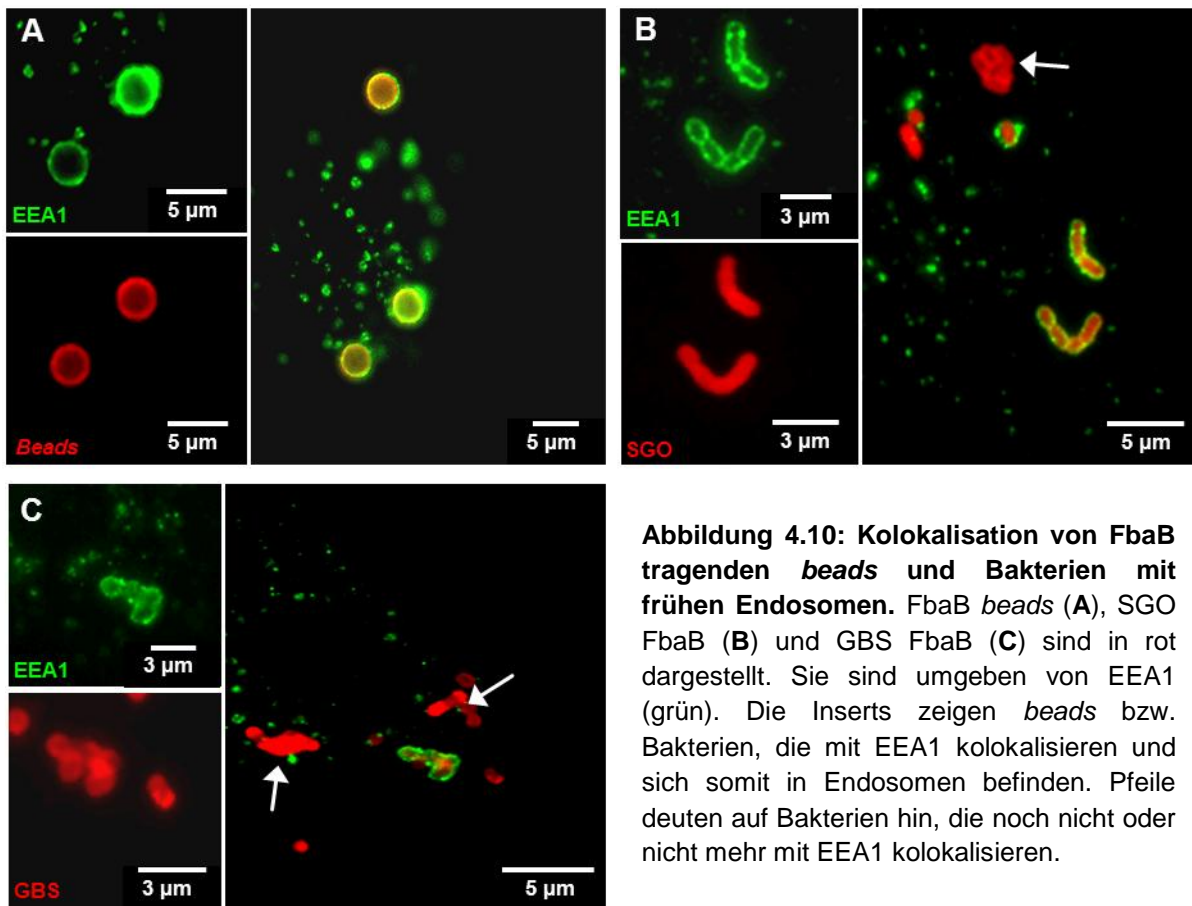
Zur Überprüfung der Kolo-kalisation mit frühen Endosomen wurden die Stämme SGO FbaB und GBS FbaB sowie FbaB-gekoppelte Latex-beads eingesetzt. Der Nachweis der Lokalisation erfolgte über zwei verschiedene endosomale Marker.

Eine Möglichkeit Endosomen spezifisch nachzuweisen bietet der endosomale Marker EEA1 (*early endosomal antigen 1*). EEA1 ist ein 162 kDa großes membrangebundendes Protein, welches spezifisch ist für frühe Endosomen und essentiell für die Fusion von früh-endozytischen Vesikeln. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ist es somit möglich, Endosomen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen.

Dafür wurden HUVEC mit FbaB-Latexpartikeln inkubiert bzw. mit SGO FbaB oder GBS FbaB infiziert, fixiert und EEA1 wurde wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben mittels Antikörperfärbung und anschließender Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.10 gezeigt ist, konnte in allen drei Systemen eine Akkumulation von EEA1 in unmittelbarer Nähe der Latexpartikel/Bakterien nachgewiesen werden. Dabei scheint es sich um eine transiente Akkumulation zu handeln, da nicht alle Latexpartikel eine gleich starke Akkumulation von

EEA1 aufweisen, bzw. nicht alle FbaB-exprimierenden Bakterien eine EEA1 Akkumulation aufwiesen (Pfeile).

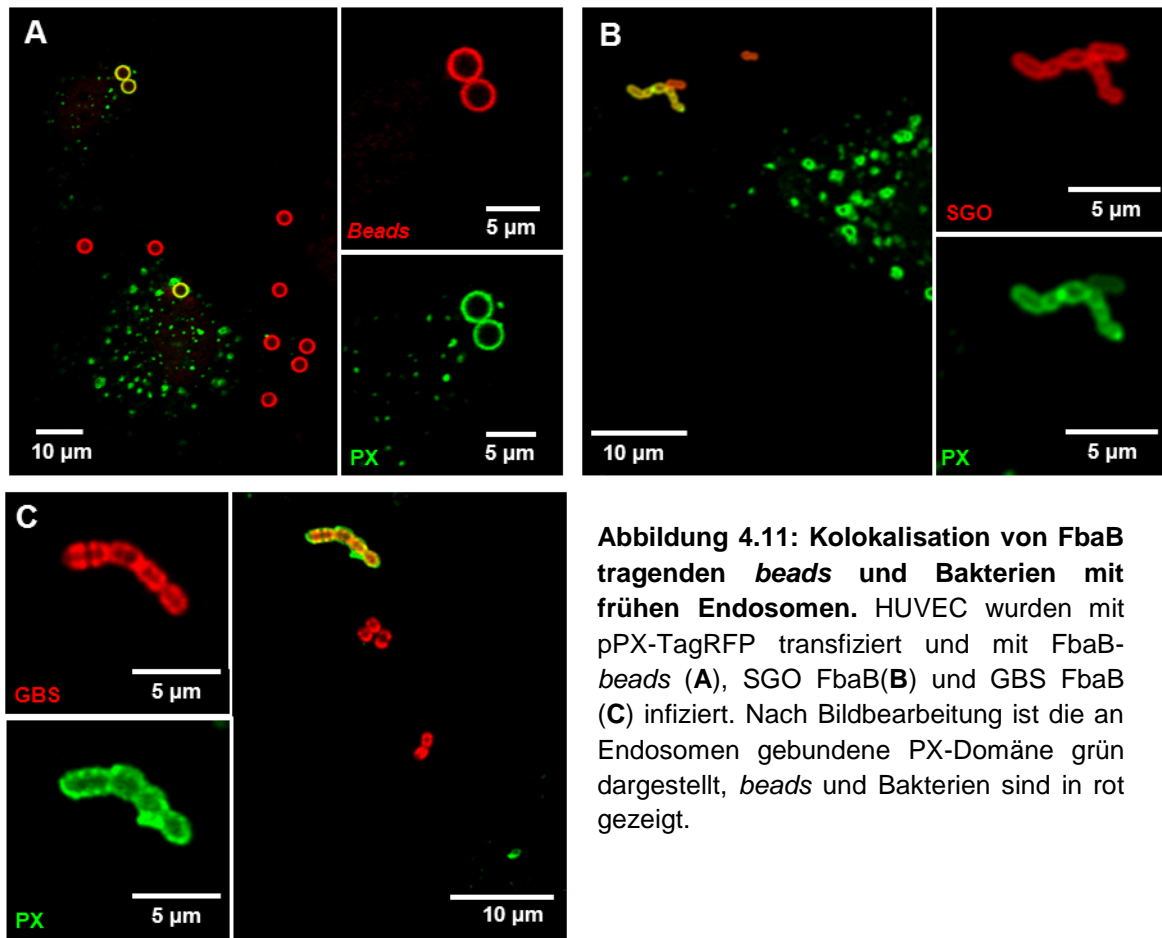
Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurden HUVEC transient mit der PX-Domäne von  $p40^{\text{PHOX}}$  transfiziert. Die Domäne bindet an Phosphatidylinositolphosphat (PI(3)P), welche spezifisch auf der Oberfläche von frühen Endosomen gebildet wird. Die PX-Domäne ist an ein rot fluoreszierendes Protein (TagRFP) gekoppelt. Endosomen fluoreszieren somit aufgrund der Bindung der PX-Domäne an  $\text{PIP}_3$  rot.



**Abbildung 4.10: Kolokalisation von FbaB tragenden beads und Bakterien mit frühen Endosomen.** FbaB beads (A), SGO FbaB (B) und GBS FbaB (C) sind in rot dargestellt. Sie sind umgeben von EEA1 (grün). Die Inserts zeigen beads bzw. Bakterien, die mit EEA1 kolokalisieren und sich somit in Endosomen befinden. Pfeile deuten auf Bakterien hin, die noch nicht oder nicht mehr mit EEA1 kolokalisieren.

Transient transfizierte HUVEC wurden wie im Falle der EEA1-Färbung stimuliert bzw. infiziert. Nach 20, bzw. 45 Minuten wurden die Zellen fixiert und die Latexpartikel bzw. die Bakterien wurden mit Antikörpern gegen FbaB bzw. SGO- und GBS-spezifischen Antikörpern und Alexa® 568- markierten Sekundärantikörpern angefärbt. Die Proben wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. In Abbildung 4.11 sind Latexpartikel und Bakterien in rot und die PX-Domäne in grün dargestellt. Es konnte ebenfalls eine Akkumulation der PX-Domäne in allen drei Systemen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass nicht alle

Latexpartikel/Bakterien mit der PX-Domäne kolokalisieren deutet wie schon im Fall der EEA1-Akkumulation auf einen zeitlich begrenzten Prozess hin.



**Abbildung 4.11: Kolokalisation von FbaB tragenden beads und Bakterien mit frühen Endosomen.** HUVEC wurden mit pPX-TagRFP transfiziert und mit FbaB-beads (A), SGO FbaB (B) und GBS FbaB (C) infiziert. Nach Bildbearbeitung ist die an Endosomen gebundene PX-Domäne grün dargestellt, beads und Bakterien sind in rot gezeigt.

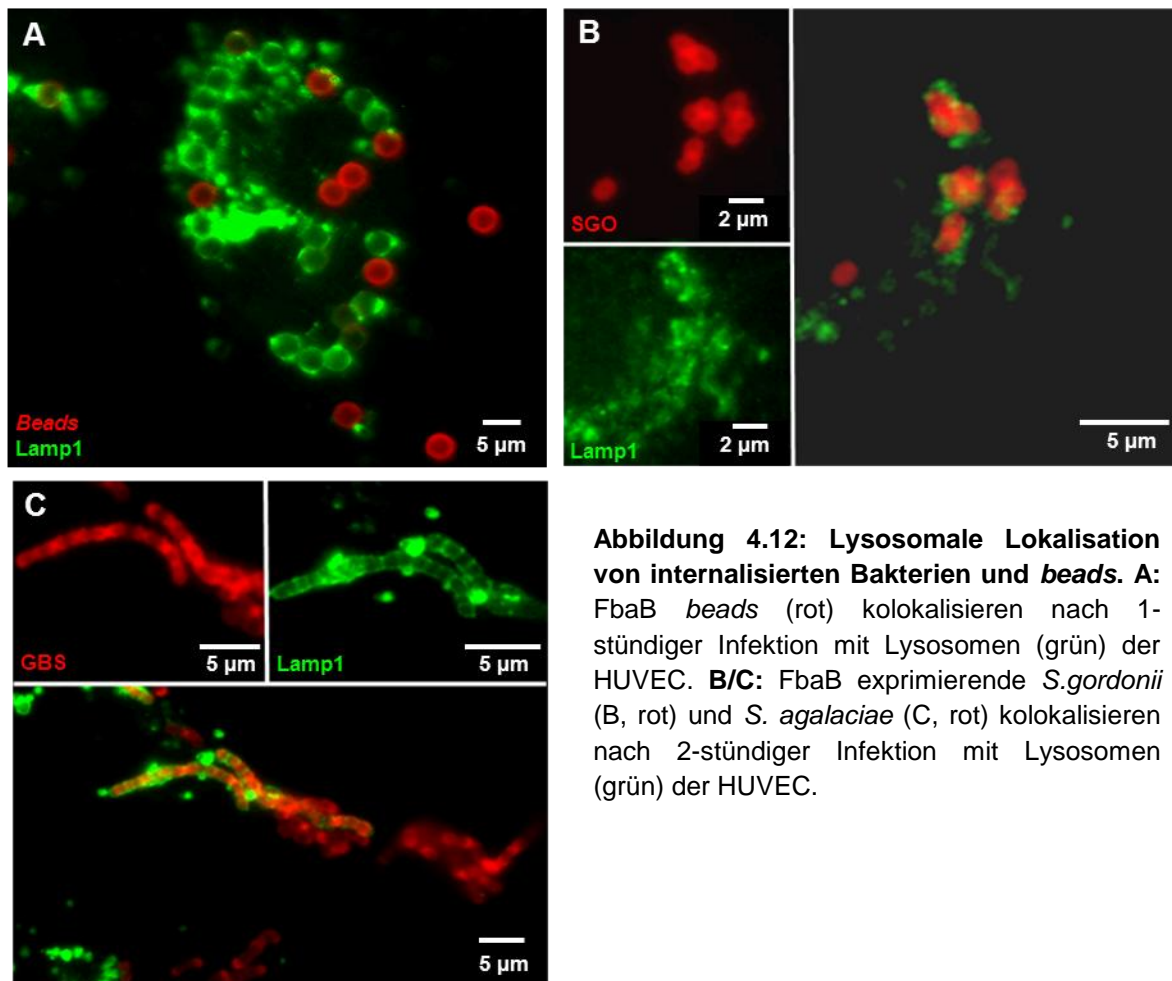
FbaB vermittelt also nach der Ausbildung von Membranausstülpungen die Aufnahme in frühe Endosomen und nimmt damit zunächst den gleichen zellulären Weg, wie sein Ursprungsorganismus *S. pyogenes* A60.

#### 4.5.2 FbaB vermittelt die Aufnahme in Lysosomen

Der klassische endozytische Weg der Endosomen führt zur Fusion mit primären Lysosomen, woraus dann sekundäre Lysosomen entstehen. Im Endosomen befindliches zellfremdes Material wird so durch die hydrolysierenden Enzyme, Lipasen und Proteasen der Lysosomen verdaut.

Gruppe A Streptokokken befinden sich nach erfolgreicher Aufnahme in Endosomen, welche mit Lysosomen fusionieren. Sie schaffen es jedoch, den feindlichen Bedingungen der

Lysosomen zu entkommen, bzw. in diesem Milieu zu überleben um anschließend via Exozytose ihre Freisetzung aus der Zelle zu induzieren.

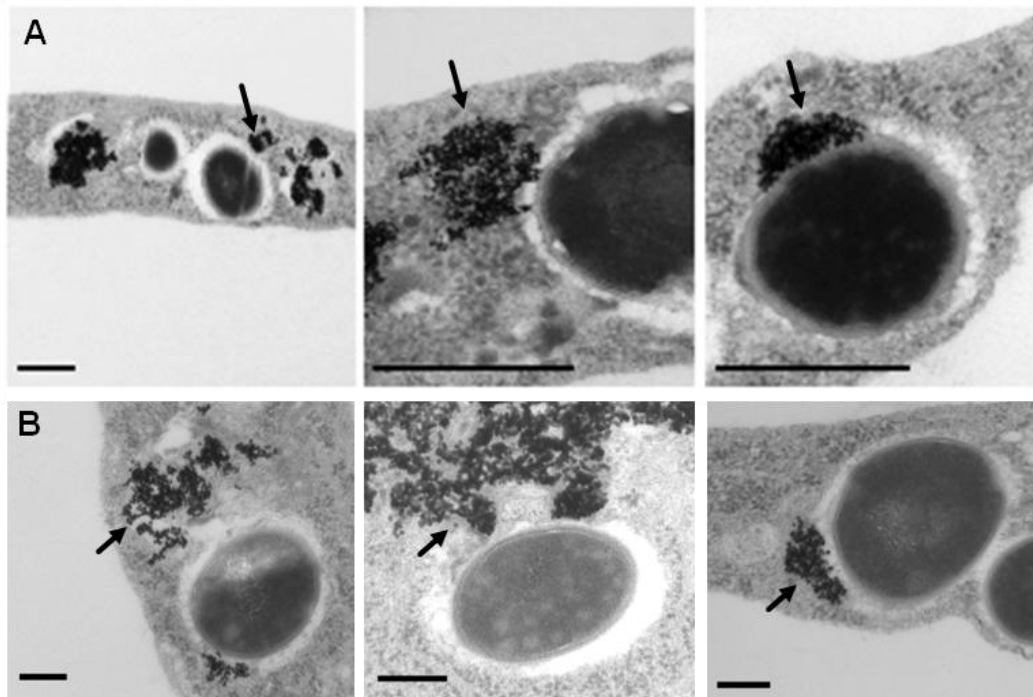


**Abbildung 4.12: Lysosomale Lokalisation von internalisierten Bakterien und beads.** A: FbaB beads (rot) kolokalisieren nach 1-stündiger Infektion mit Lysosomen (grün) der HUVEC. B/C: FbaB exprimierende *S. gordonii* (B, rot) und *S. agalaciae* (C, rot) kolokalisieren nach 2-stündiger Infektion mit Lysosomen (grün) der HUVEC.

Auch im Falle von FbaB lag die Vermutung nahe, dass Endosomen, die FbaB-Latexpartikel bzw. FbaB-exprimierende SGO/GBS enthalten, mit Lysosomen verschmelzen. Um dies zu bestätigen, wurden mit SGO FbaB, GBS FbaB und FbaB beads infizierte Zellen nach der Fixierung mit einem spezifischen Antikörper gegen späte Endosomen/Lysosomen markiert. Als Marker für Lysosomen diente hier LAMP-1, das mit Lysosomen assoziiertes Membranprotein 1, welches auch als CD107a bekannt ist. Abbildung 4.12 zeigt in den Lysosomen (grün) befindliche SGO FbaB, GBS FbaB und FbaB-beads (rot). Auch hier ist wie schon bei den Endosomen deutlich eine Kolokalisation von roter und grüner Fluoreszenz bei einer Vielzahl der Latexpartikel/Bakterien nachweisbar.

Deutlich wird die Fusion von Lysosomen mit dem Phagosom in Abbildung 4.13. Hierfür wurde ein Tag vor der Infektion mit GBS FbaB (bzw. SGO FbaB) BSA-gekoppeltes Gold auf

die Zellen gegeben. Bis zur Infektion am nächsten Tag wurden dann alle von den Zellen aufgenommenen Goldpartikel durch Phagozytose in die Lysosomen transportiert. Nach der



**Abbildung 4.13: Elektronenmikroskopische Schnitte von FbaB-exprimierenden Bakterien in HUVEC.** GBS FbaB (A) und SGO FbaB (B) befinden sich nach 2 Stunden Infektionszeit in der Nähe des BSA-beladenen Goldes (Pfeile), welches in Lysosomen lokalisiert ist. (Maßstabsbalken in A: 1µm; Maßstabsbalken in B: 200nm)

Infektion für zwei Stunden und der Fixierung erfolgte die Aufbereitung für elektronenmikroskopische Aufnahmen. Abbildung 4.13 zeigt Schnitte durch eine HUVEC Zelle. Deutlich ist hier das Gold als schwarzes, elektronendichtes Material (siehe Pfeile) zu erkennen, welches in Lysosomen lokalisiert ist. Da sich in diesen Vesikeln auch die FbaB exprimierenden Stämme befinden, lässt sich daraus schlussfolgern, dass die früheren Endosomen mit den Lysosomen fusioniert sind.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass FbaB – gekoppelt an die Oberfläche von Latexpartikeln bzw. heterolog auf der Oberfläche von normalerweise nicht-invasiven Bakterien exprimiert – den klassischen endozytischen Weg ansteuert, in dem Endosomen mit Lysosomen verschmelzen.



## 4.6 Rolle von Rac1 bei der FbaB vermittelten Aufnahme

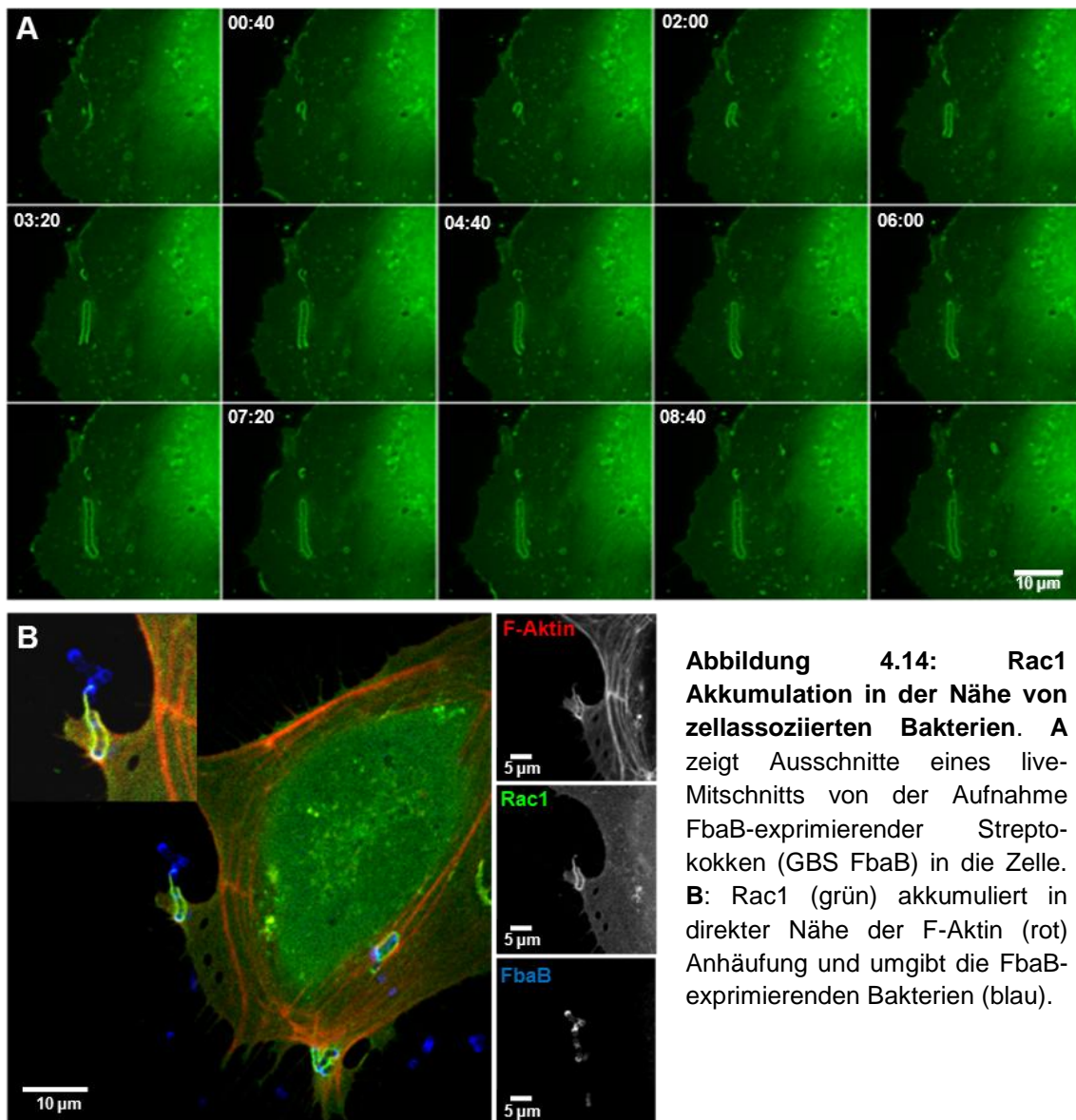
Gruppe A Streptokokken vom Serotyp M3 lösen in der Endothelzelle eine Signalkaskade aus, infolge derer es zur Ausstülpung der Membran, gefolgt von der Aufnahme der Bakterien, kommt. Für diese gezielte und genau definierte Ausstülpung wird F-Aktin depolymerisiert und am Invasionsort neu polymerisiert. Dieser Schritt steht jedoch am Ende eines intrazellulären Signalweges, der ausgelöst wurde durch das Anheften der Bakterien an die Zelle. Für die Aufnahme von GAS M3 in Endothelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass die kleine GTPase Rac1 bei diesem Prozess eine essentielle Rolle spielt (Nerlich 2009).

Rac1 ist, wie Rho und Cdc42, Mitglied der Rho-Familie. Dies ist eine Gruppe kleiner GTP-bindender Proteine, die molekulare Schalter darstellen. Sie sind unter anderem für die Änderung der Zellmorphologie verantwortlich. Während RhoA mit der Bildung von Stressfasern in Verbindung gebracht wird und Cdc42 mit der Bildung von Mikrospiques, ist Rac1 verantwortlich für die Ausbildung von sogenannten *membrane ruffles*, also Membranprotrusionen, wie sie zum Beispiel für Lamellipodien typisch sind.

### 4.6.1 FbaB vermittelte Aufnahme führt zur Aktivierung und Akkumulation von Rac1 am Invasionsort

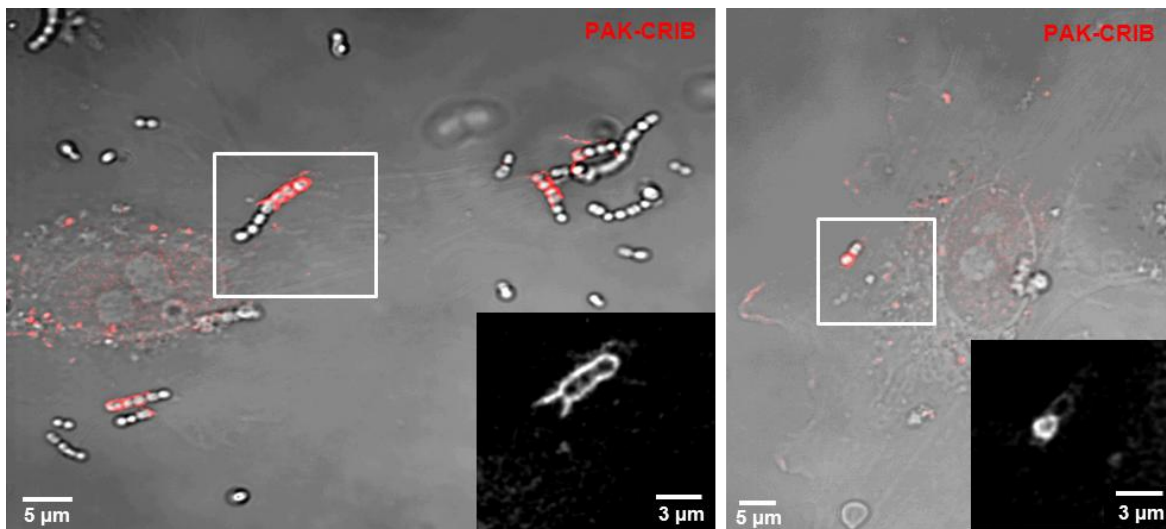
Um den Einfluss von Rac1 bei der FbaB vermittelten Aufnahme zu untersuchen, wurden HUVEC zunächst mit pEGFP-Rac1WT transfiziert. Nach ca. 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen mit GBS FbaB infiziert. Die Rekrutierung von Rac1 am Invasionsort wurde anschließend mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Zum einen wurde die Rekrutierung von Rac1 im Moment der Aufnahme der Bakterien in einem Film festgehalten (Abb. 4.14 A). Zum anderen wurden Zellen nach Infektion fixiert und die Akkumulation von Rac1 am Invasionsort durch differentielle Fluoreszenzfärbung von F-Aktin und Streptokokken aufgenommen (Abb. 4.14 B).

In Abbildung 4.14 A ist zu sehen, dass es im zeitlichen Verlauf der Aufnahme der Bakterien zu einer Anhäufung von Rac1 in der Nähe der Bakterien kommt. Dies konnte auch durch weitere konfokale Aufnahmen in Abbildung 4.14 B bestätigt werden. Auch hier ist die Rekrutierung von Rac1 in der Nähe der zellassoziierten Bakterien sichtbar. Des Weiteren ist genau in diesem Bereich auch eine Akkumulation von F-Aktin beobachtbar. Dies deutet auf eine Beteiligung von Rac1 bei der Reorganisation des F-Aktins während der Aufnahme der Bakterien hin.



**Abbildung 4.14: Rac1 Akkumulation in der Nähe von zellassozierten Bakterien.** A zeigt Ausschnitte eines live-Mitschnitts von der Aufnahme FbaB-exprimierender Streptokokken (GBS FbaB) in die Zelle. B: Rac1 (grün) akkumuliert in direkter Nähe der F-Aktin (rot) Anhäufung und umgibt die FbaB-exprimierenden Bakterien (blau).

Als nächstes sollte untersucht werden, ob durch FbaB außer der Akkumulation auch die Aktivierung von Rac1 ausgelöst wird. Hierfür wurden HUVEC mit der *Cdc42-Rac1 interactive binding domain* (CRIB) von PAK1 transfiziert, die wiederum an ein rot-fluoreszierendes Protein (TagRFP) gekoppelt war (pCRIB-TagRFP). CRIB ist in der Lage, spezifisch an aktives Rac1/Cdc42 zu binden. Während Rac1 seinen Zustand von GDP zu GTP-gebunden wechselt, d.h. vom inaktiven in den aktiven Zustand wechselt, kommt es zu einer Konformationsänderung. Erst durch diese Änderung der Konformation ist es möglich, dass die CRIB-Domäne an Rac1 binden kann (Itoh *et al.*, 2002). Eine Akkumulation von TagRFP am Invasionsort ergab somit den Nachweis von aktivem Rac1 (und Cdc42).



**Abbildung 4.15: Aktivierung von Rac1 während der Internalisierung von GBS FbaB in HUVEC.** HUVEC wurden mit CRIB-Pak, gekoppelt an ein rot-fluoreszierendes Protein transfiziert. Da die CRIB-Domäne an aktives Rac1 binden kann, spiegelt die rote Fluoreszenz im Moment der Aufnahme GTP-gebundenes Rac1 wieder. Dieses akkumuliert um den Teil der Kokken, der bereits internalisiert wurde. Bakterien und HUVEC sind im Phasenkontrast dargestellt. Aktives Rac1 in rot, bzw. in vergrößerter Form in schwarz-weiß.

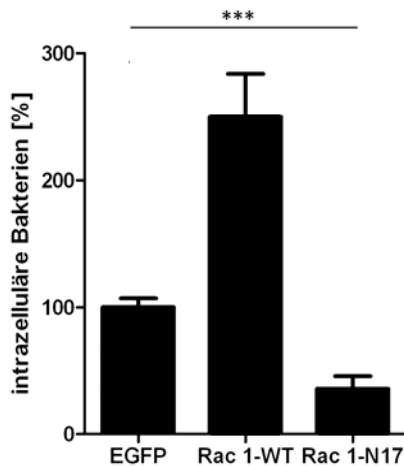
In Abbildung 4.15 ist eine Akkumulation von rot-fluoreszierendem CRIB und somit aktivem Rac1 zu erkennen, welches Streptokokken umgibt, die sich gerade in der Aufnahmephase befinden. Die Streptokokken sind im Phasenkontrast dargestellt, CRIB ist in rot, bzw. in schwarz-weiß dargestellt. Legt man beide Bilder übereinander, kann man deutlich erkennen, dass Kokken, die sich im Prozess der Aufnahme befinden, von CRIB und somit von aktivem Rac1 umgeben werden.

Ein Vergleich der Aufnahmen aus den Abbildungen 4.14 und 4.15 zeigt, dass, ausgelöst durch die Adhäsion FbaB-exprimierender Bakterien, Rac1 zum Invasionsort rekrutiert wird und dort durch seine Aktivierung die Internalisierung der Bakterien auslöst.

#### 4.6.2 Rac1 ist essentiell für die Internalisierung

Um zu testen, wie essentiell die Aktivierung von Rac1 bei der FbaB vermittelten Aufnahme ist, wurden Zellen mit einer Wildtyp Rac1 (Rac1-WT, pEGFP-RacWT) und einer dominant negativen Form von Rac1 (Rac1-N17, pEGFP-RacN17) transfiziert. In beiden Fällen kommt es zu einer Überexpression der jeweiligen Rac1-Form, wobei aber die Produktion von endogenem Rac1 trotzdem stattfindet. Ca. 24 Stunden nach der Transfektion wurde eine Infektion mit GBS FbaB gestartet. Nach 2 Stunden Infektionszeit wurden die Zellen fixiert. Mit

polyklonalem Anti-GBS Antikörper und Alexa-488®- sowie Alexa-568®-konjugierten Sekundärantikörpern wurden anschließend extra- und intrazelluläre Bakterien differentiell gefärbt. Intrazelluläre Bakterien wurden ausgezählt um die Invasionsrate zu bestimmen.



**Abbildung 4.16: Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB in Rac1-WT und Rac1-N17 exprimierende Zellen.** HUVEC wurden mit Rac1-WT, Rac1-N17, der Kontrolle EGFP transfiziert und für 2 Stunden mit GBS FbaB infiziert. Gezeigt ist hier die prozentuale Invasionsrate der Bakterien, bezogen auf EGFP-transfizierte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD eines repräsentativen, von 4 unabhängigen Experimenten (\*\*\*) $p < 0,0001$ .

Als Kontrolle wurden Zellen mit dem entsprechenden Leervektor pEGFP transfiziert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei Rac1-WT transfizierten Zellen eine statistisch signifikante um ca. 150 % erhöhte Invasionsrate. Zellen, welche mit der dominant negativen Form von Rac1 transfiziert wurden, zeigten eine statistisch signifikante um ca. 70 % verringerte Aufnahmefähigkeit von Streptokokken bezogen auf die EGFP-transfizierten Kontrollzellen (Abbildung 4.16).

Zusammenfassend lässt sich aus den gewonnenen Ergebnissen schlussfolgern, dass durch die Anheftung der FbaB-exprimierenden Bakterien an die Zellmembran intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, in denen Rac1 eine essentielle Rolle spielt. Es ist mitverantwortlich für die Aufnahme von Bakterien, welche durch Membranausstülpungen, in die Nähe der Bakterien gekennzeichnet ist. Es wird am Invasionsort für kurze Zeit aktiviert und akkumuliert dort. Ohne funktionsfähiges Rac1 sind HUVEC kaum in der Lage Bakterien aufzunehmen, bzw. FbaB-exprimierende Bakterien nicht in der Lage die Zelle zu invadieren.

## 4.7 Untersuchung der intrazellulären Signalwege bei der FbaB vermittelten Invasion

Die Bildungen von Membranprotrusionen sind komplexe Vorgänge, die mit der Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, ausgelöst z.B. durch die Bindung der Bakterien an die Membran, einhergehen.

Durch die Fibronectin-bindenden Proteine SfbI und M1 werden nach dem *clustern* von Integrinen in der Wirtszelle verschiedene Kinasen rekrutiert und phosphoryliert. Infolgedessen kommt es dann zu einer Veränderung des Aktinzytoskeletts und zur Aufnahme der Bakterien.

Nerlich *et al.* konnten 2009 zeigen, dass die Aufnahme von *S. pyogenes* M3-Serotyp abhängig ist von Tyrosin Kinasen der Src-Familie. Im Gegensatz zum M1-Serotyp ist sie aber unabhängig von Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K). Neuste Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die Aufnahme von GAS M3 abhängig von intrazellulären Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und von der Proteinkinase C (PKC) ist.

In vorherigen Versuchen konnte FbaB als Oberflächenprotein von GAS M3 bereits als starkes Invasin für Endothelzellen identifiziert werden. Nun stellte sich die Frage, inwiefern FbaB die Signalwege in den Endothelzellen beeinflusst. Werden durch FbaB die gleichen Faktoren aktiviert wie durch seinen Ursprungstamm A60?

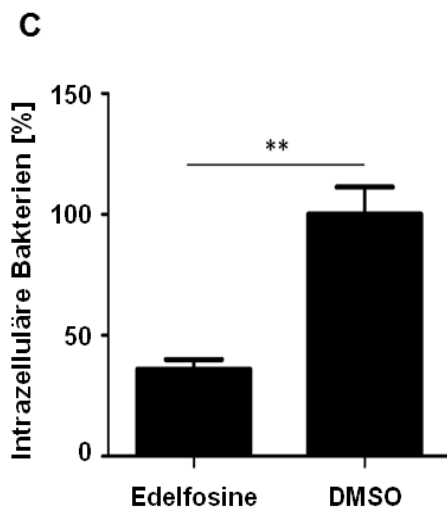
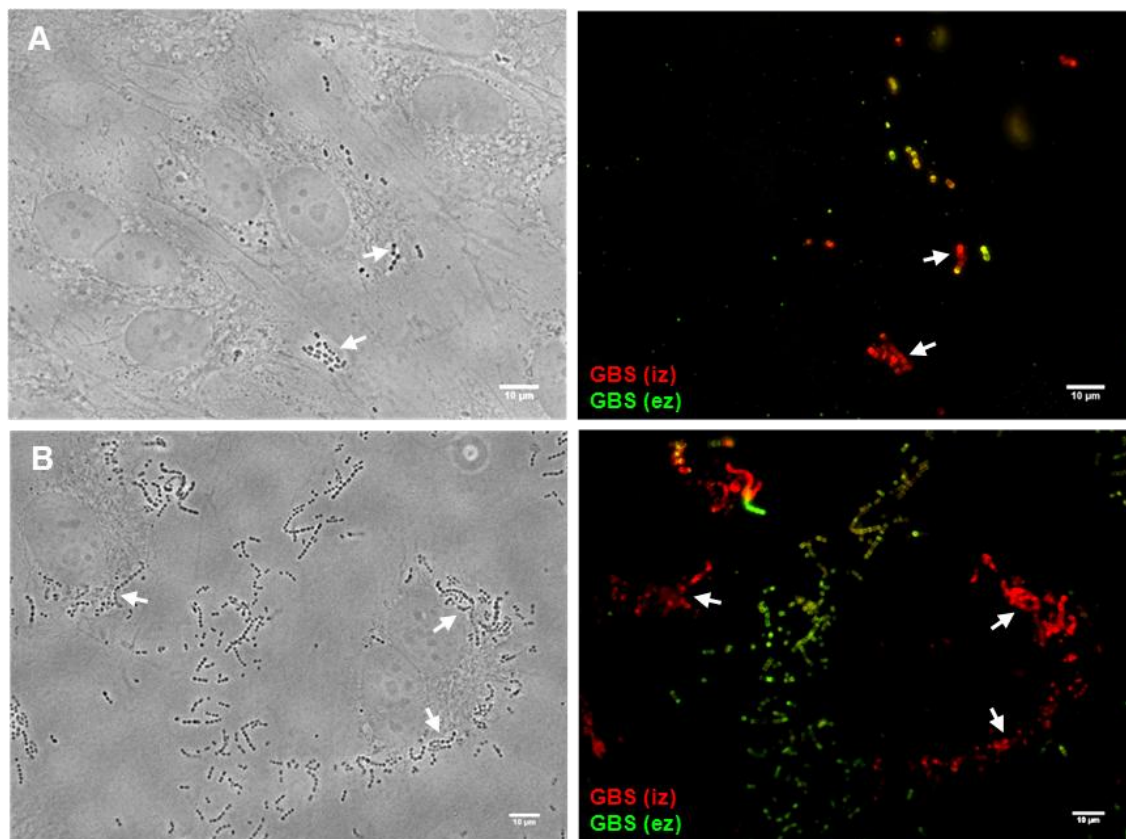
### 4.7.1 Phospholipase C ist an der FbaB-vermittelten Aufnahme beteiligt

Die Phospholipase C (PLC) ist ein Protein, das in *lipid rafts* lokalisiert ist. Es hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu dem *second messenger* Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Somit stellt es ein wichtiges Enzym für die Weiterleitung von Signalen vom Zelläußeren zum Zellinneren dar. DAG und  $\text{IP}_3$  haben außerdem Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett.

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass auch die PLC am Invasionsprozess von *S. pyogenes* M3 in Endothelzellen beteiligt ist. Somit ist sie ein weiterer Kandidat für die FbaB-vermittelte intrazelluläre Signalweiterleitung. Um eine Abhängigkeit der FbaB-vermittelten Aufnahme von PLC zu untersuchen, wurden wieder Infektionsversuche durchgeführt. Ca. 30 Minuten vor Infektionsbeginn wurden HUVEC Zellen jedoch mit 20  $\mu\text{M}$  Edelfosine prä-inkubiert. Edelfosine ist ein Phospholipid, welches die Phospholipase C inhibiert. Da Edelfosine in DMSO verdünnt wird, dienten als Kontrolle Zellen, welche mit DMSO prä-inkubiert wurden.

Nachdem die Zellen für 2 Stunden mit GBS FbaB infiziert wurden, wurde nach Fixierung und Färbung die Zahl der intrazellulären Bakterien bestimmt. Die Kontrolle diente dabei als 100 %-Wert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zahl der invasiven Bakterien bei einer Präinkubation mit Edelfosine sinkt (Abbildung 4.17). Im Vergleich zur Kontrolle gelangten durch die Blockade mit Edelfosine ca. 65% weniger Bakterien in die Zelle.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der Phospholipase C an der FbaB-vermittelten Aufnahme hin.

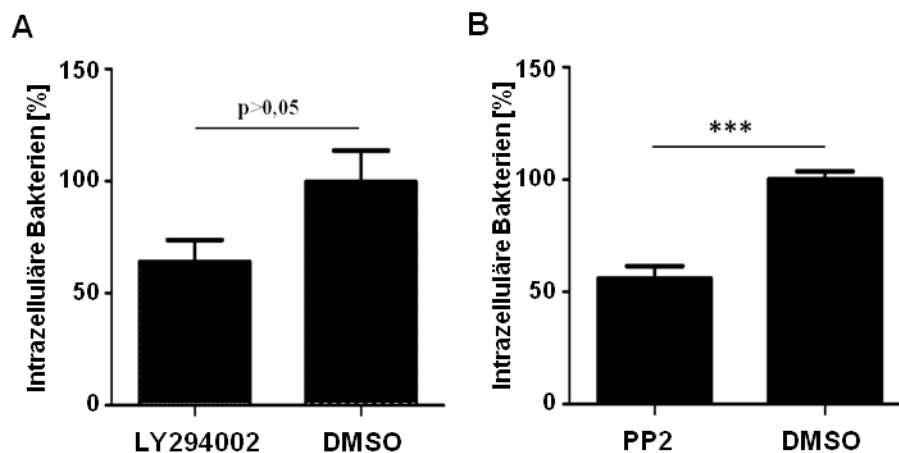


**Abbildung 4.17: Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB bei Inhibition der PLC.** GBS FbaB auf/in HUVEC nach Inhibition der PLC (A) bzw. nach Präinkubation mit dem Kontrollagenz DMSO (B) im Phasenkontrast (intrazelluläre Bakterien siehe Pfeil) und in der DIF. (rot: intrazelluläre GBS FbaB, gelb/grün extrazelluläre GBS FbaB) C: Prozentualer Anteil intrazellulärer Bakterien nach Präinkubation der Zellen, bezogen auf die Kontrolle DMSO. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, bezogen auf ein repräsentatives von 4 unabhängigen Experimenten; \*\* $p \leq 0,002$ ).

### 4.7.2 Rolle der PI3-Kinase und der Src-Kinase bei der FbaB-vermittelten Aufnahme

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase ist für die Aufnahme von Gruppe A Streptokokken in Epithelzellen von essentieller Bedeutung. Die Fibronectin-Bindungsproteine SfbI und M1 induzieren über PI3K-Aktivierung eine Aktinpolymerisation, was zur Aufnahme der Bakterien in die Zellen führt (Cleary 2007). Nerlich *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass die Aufnahme von Gruppe A Streptokokken des Serotyps M3 in Endothelzellen ein PI3K-unabhängiger Prozess ist, der jedoch Src-Kinase abhängig ist.

Wenn FbaB der bakterielle Faktor ist, der die Invasion von M3 GAS in Endothelzellen vermittelt, sollte auch der FbaB-vermittelte Prozess unabhängig von PI3K, aber abhängig von der Src-Kinase sein.



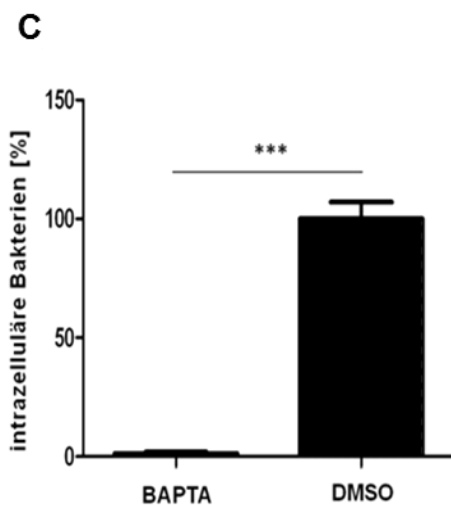
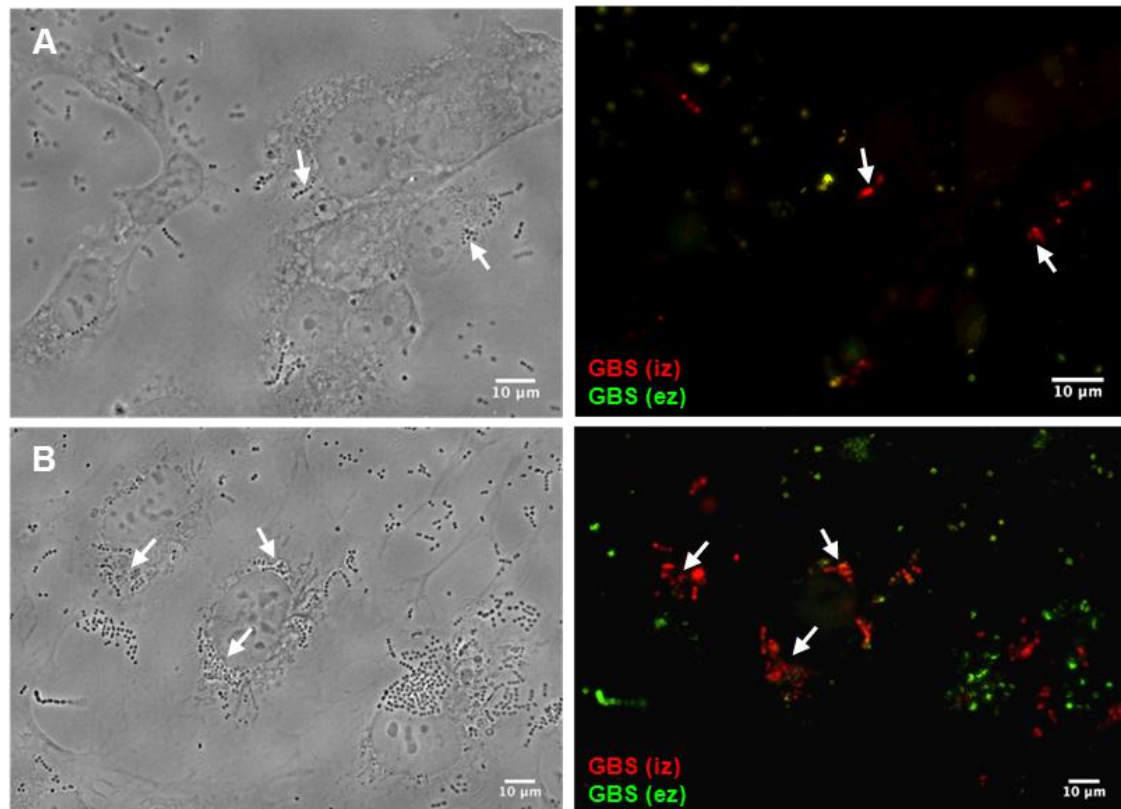
**Abbildung 4.18: Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB nach der Inhibierung von PI3- und Src-Kinase.** HUVEC wurden mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (A) bzw. mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2 (B) präinkubiert. Parallel wurden HUVEC mit dem Kontroll-Agenz DMSO präinkubiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil intrazellulärer Bakterien im Vergleich zur Kontrolle DMSO. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, bezogen auf ein repräsentatives von 4 unabhängigen Experimenten;  $p=0,07$  (A),  $***p\leq 0,0005$  (B)).

Um dies zu überprüfen wurden HUVEC Zellen eine halbe Stunde vor Infektion mit GBS FbaB mit dem PI3K-Inhibitor LY294002, bzw. mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2 präinkubiert. Hierfür wurden die bereits publizierten Konzentrationen von 25  $\mu$ M (LY294002) und 5  $\mu$ M (PP2) eingesetzt. Nach einer Infektionszeit von 2 Stunden wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie wieder die Anzahl der intrazellulären Bakterien bestimmt. Wie in Abbildung 4.18 zu sehen ist, führt eine Blockade der PI3-Kinase zu einer Reduktion der



Aufnahme um nur ca. 35%. Auch eine Blockade der Src-Kinase führt nur zu einer Reduktion der Aufnahme um ca. 45%. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Kinasen für die FbaB-vermittelte Aufnahme nicht essentiell zu sein scheinen. Es kann an dieser Stelle keine genaue Aussage darüber getroffen werden, ob sie an der FbaB-vermittelten Aufnahme beteiligt sind.

#### 4.7.3 Intrazelluläres Calcium ist notwendig für eine erfolgreiche Aufnahme



**Abbildung 4.19: Quantifizierung der Internalisierung von GBS FbaB in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ .** GBS FbaB auf/in HUVEC nach Behandlung mit BAPTA-AM (A) bzw. nach Behandlung mit dem Kontrollagenz DMSO (B) im Phasenkontrast (intrazelluläre Bakterien siehe Pfeil) und in der DIF. (rot: intrazelluläre GBS FbaB, gelb/grün extrazelluläre GBS FbaB) C: Prozentualer Anteil intrazellulärer Bakterien nach Behandlung der Zellen, bezogen auf die Kontrolle DMSO. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, bezogen auf ein repräsentatives von 4 unabhängigen Experimenten; \*\*\* $p < 0,0001$ ).



Neben DAG und  $\text{IP}_3$  ist freies Calcium ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{[i]}}$ ) ein weiterer wichtiger *second messenger* in Zellen.  $\text{IP}_3$  diffundiert ins Zytoplasma und fördert dort die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}_{\text{[i]}}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum. DAG sorgt dann zusammen mit den Calcium-Ionen für die Aktivierung der Proteinkinase C, welche ihrerseits wiederum eine Rolle spielt bei der Aktin-Polymerisation.

Da es bei der Aufnahme von Bakterien zu einer Aktin-Polymerisation kommt, liegt es nahe, dass auch Calcium-Ionen eine Rolle in diesem Prozess spielen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass  $\text{Ca}^{2+}_{\text{[i]}}$  für die Aufnahme von GAS M3 in Endothelzellen eine ganz entscheidende Rolle spielt. Komplextiert man intrazelluläres Calcium durch die Zugabe von BAPTA-AM, sind die Bakterien nicht mehr in der Lage, die Zelle zu invadieren.

Um nun herauszufinden inwiefern auch die FbaB-vermittelte Aufnahme  $\text{Ca}^{2+}_{\text{[i]}}$  abhängig ist, wurden HUVEC 30 Minuten vor Infektionsbeginn mit BAPTA-AM prä-inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wird freies intrazelluläres Calcium komplexiert und ist somit nicht mehr zugänglich für Kinasen. Anschließend wurden die Zellen wieder mit GBS FbaB für zwei Stunden infiziert und intrazelluläre Bakterien mittels Fluoreszenzmikroskopie gezählt. Wie in Abbildung 4.19 zu sehen ist, kam es nach BAPTA-AM Präinkubation zu einer Abnahme der Invasion um ca. 95%. Für die FbaB-vermittelte Aufnahme ist intrazelluläres freies Calcium somit essentiell.

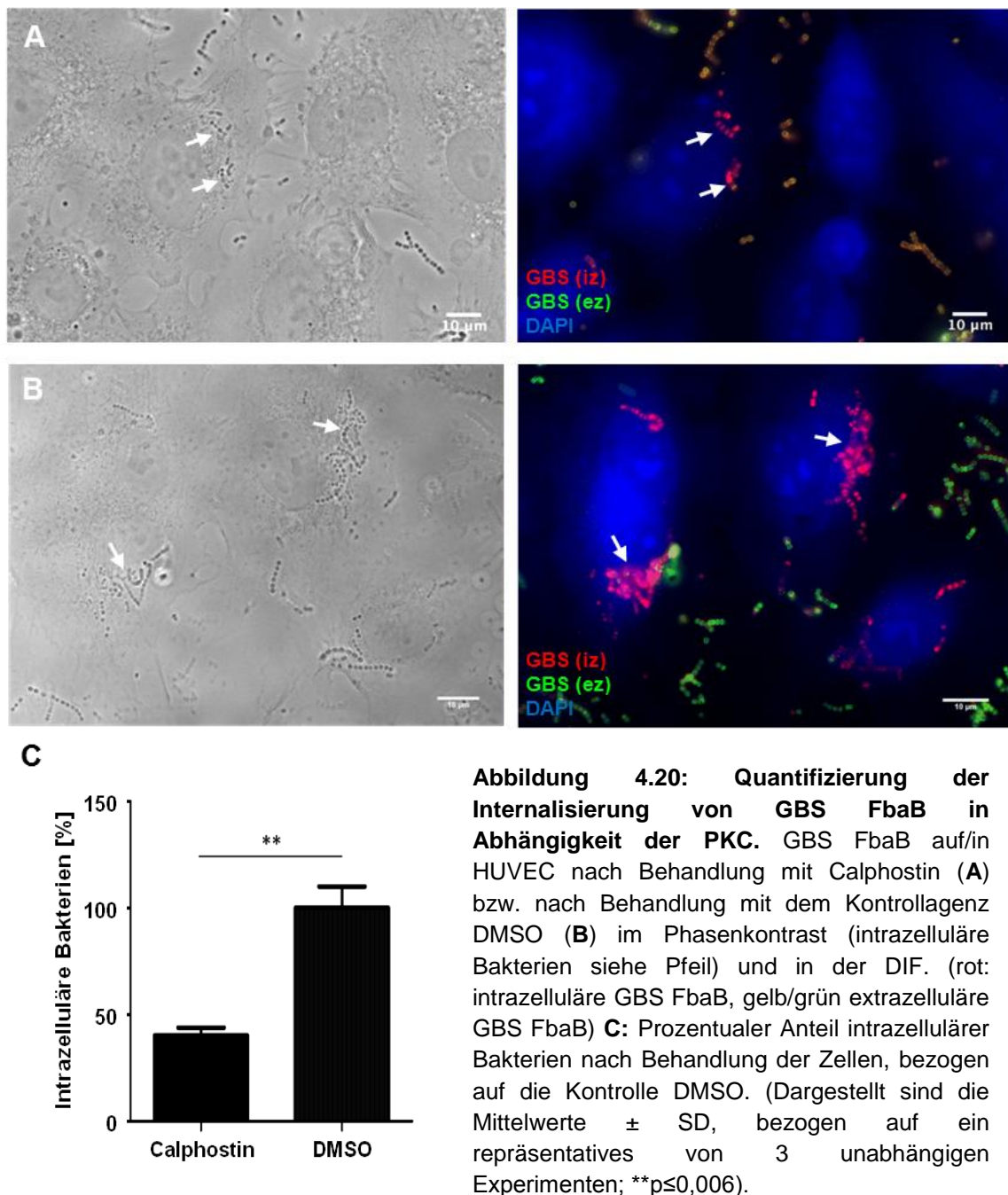
### 4.7.4 Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) bei der FbaB-vermittelten Aufnahme

Die Proteinkinase C steuert die Aktivität nachgeordneter Enzyme durch die Übertragung von Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen. Sie besitzt auf Grund ihrer regulatorischen Funktion eine zentrale Rolle bei der zellulären Signaltransduktion. Für die Aktivität der PKC sind neben Phospholipiden auch Calciumionen und DAG nötig. PKC wiederum steht in Verbindung mit der Aktivierung kleiner GTPasen wie Rac, Cdc42 und Rho.

Vergangene Arbeiten von S. Talay (unpublizierte Daten) zeigen, dass auch die PKC am Invasionsprozess von M3 *S. pyogenes* beteiligt ist. Calphostin ist unter Lichteinwirkung ein starker Inhibitor von PKC, der in höheren Konzentrationen die Zellproliferation inhibieren kann und Apoptose auslösen kann. Eine Inhibition der PKC mit Calphostin ergab eine Reduktion der Invasionsrate von M3 GAS um ca. 80%.

Um auch für die FbaB-vermittelte Aufnahme eine Beteiligung der PKC nachzuweisen, wurden HUVEC 30 Minuten vor der Infektion mit 2  $\mu\text{M}$  Calphostin präinkubiert. Da Calphostin ein selektiver Inhibitor der Proteinkinase C ist, sollten vor der anschließenden Infektion der

Zellen mit GBS FbaB die PKC inaktiviert sein. Nach einer zweistündigen Infektionsdauer wurden die Zellen fixiert und für die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgearbeitet. Abbildung 4.20 C zeigt, dass die prozentuale Invasionsrate von GBS FbaB nach Behandlung mit Calphostin um ca. 60% sinkt. Damit ist gezeigt, dass die PKC an der FbaB-vermittelten Invasion beteiligt ist. Inwiefern sie für die Aufnahme essentiell ist, kann jedoch nicht gesagt werden.



Betrachtet man den Weg, den Gruppe A Streptokokken vom Serotyp M3 nehmen um durch die Endothelzellen transportiert zu werden, kann man sagen dass dieser sehr dem von

FbaB-vermitteltem Weg ähnelt. Des Weiteren scheint FbaB auch nahezu denselben intrazellulären Signalweg auszulösen wie GAS. Dies alles deutet darauf hin, dass es sich bei FbaB um das Oberflächenprotein von Gruppe A Streptokokken vom Serotyp M3 handelt, welches maßgeblich die Invasion in Endothelzellen vermittelt.

## 5. Diskussion

Infektionen mit *Streptococcus pyogenes* gehören zu den häufigsten Erkrankungen weltweit. Zwar überwiegt die Anzahl nicht-invasiver Erkrankungen, doch können auch Folgeerkrankungen zum Tod führen. 1989 wurde von einer Serie von GAS-Infektionen in den USA berichtet, bei der Patienten Symptome aufwiesen wie plötzlicher Schock, posttraumatische Lungeninsuffizienz, Nierenversagen, Bakteriämie und Tod (Stevens *et al.*, 1989). Später wurde diese Erkrankung offiziell als *streptococcal toxic shock syndrome* (STSS) bezeichnet (The Working Group on Severe Streptococcal Infections, 1993). Trotz verbesserter klinischer Diagnosemöglichkeiten und intensiver Erforschung der Virulenzfaktoren sind Erkrankungen durch *S. pyogenes* immer noch sehr häufig und die Todesrate liegt zwischen 30 und 70% (Bisno & Stevens, 1996). Verschiedene Studien und Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen invasiven Erkrankungen und den Serotypen M1, M3, M12 und M28 hin. Aus Patienten, bei denen eine Eintrittspforte für die Bakterien bekannt war, konnten in 40% aller Fälle die Serotypen M1 und M3 isoliert werden. Es gab jedoch auch Patienten, die an STSS erkrankten, ohne eine äußere Verletzung aufzuweisen, die als Zutritt für die Erreger dienen könnte. In diesen Fällen waren sogar 50% der Isolate vom Serotyp M1 oder M3 (Bisno & Stevens, 1996). Gruppe A Streptokokken müssen folglich die Fähigkeit besitzen, verschiedene Gewebsbarrieren zu passieren und den zahlreichen Abwehrmechanismen des Immunsystems zu umgehen.

Eine bedeutsame Gewebsbarriere stellt das Endothel dar. Mit einer Dicke von über 1  $\mu\text{m}$  bildet es eine physikalische Barriere zwischen Blutlumen und dem perivaskulären Gewebe. Durch spezialisierte Strukturen wie der Oberflächenglycokalyx, Mikrovesikeln, transzellulären Kanälen und aktiven Transportmechanismen ist das Endothel selektierend und permeabel für zu transportierende Makromoleküle. Von verschiedenen Pathogenen ist eine Interaktion mit dem Endothel bereits beschrieben. *Neisseria meningitidis* bspw. überwinden die Blut-Hirnschranke durch Interaktion ihres Typ IV Pilus mit dem Endothel (Coureuil *et al.*, 2009) und auch *Streptococcus pneumoniae* passiert das Endothel mit Hilfe des Virulenzfaktors Pneumolysin (Hirst *et al.*, 2004). Da auch *S. pyogenes* in Verbindung mit schweren invasiven Erkrankungen steht, liegt die Vermutung nahe, dass auch dieses Pathogen die Endothelbarriere überwinden kann, um in tiefer liegendes Gewebe zu gelangen. Zur Überwindung des Endothels wären drei Varianten denkbar: (i) parazelluläre Migration, d.h. Transmigration der Bakterien durch die Zwischenräume der Zellen, (ii) Transmigration mit Hilfe von anderen Zellen, wie zum Beispiel PMNs oder Lymphozyten, die über den Kontakt mit dem Endothel aus der Blutbahn emigrieren und (iii) transzelluläre Migration direkt durch die Endothelzellen hindurch. Letztere Variante konnte für M3 GAS gezeigt

werden (Talay *et al.*, in Revision). Nach der Adhäsion der Streptokokken wird eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts ausgelöst, die in der Aufnahme der Bakterien resultiert. Anschließend fusionieren die Bakterien intrazellulär mit Endosomen und später mit Lysosomen (ähnlich dem Verlauf der klassischen Phagozytose). *Ex vivo* Versuche mit menschlicher Nabelschnur zeigten jedoch, dass *S. pyogenes* in der Lage ist, sich der Degradation durch Lysosomen zu entziehen und auf der Lumen-abgewandten Seite mittels Exozytose wieder zu entkommen (Talay *et al.*, in Revision).

Voraussetzung für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes ist die Adhäsion an die Zielzelle. Nach einer harmlosen Pharyngitis kann es zu einer Invadierung des Rachenepithels kommen, von wo aus sich die Bakterien über den Blutkreislauf in tiefer liegende Gewebsschichten ausbreiten können. Die Interaktion von *S. pyogenes* mit dem Endothel, welches die Blutbahn auskleidet, wurde im Gegensatz zum Epithel bisher kaum untersucht. So beschränken sich nahezu alle bisher identifizierten Adhäsine auf die Interaktion mit dem Epithel. Neben den Kollagen-bindenden Proteinen (Dinkla *et al.*, 2003; Podbielski *et al.*, 1999), können auch die Hyaluronsäurekapsel der Kokken (Schrager *et al.*, 1998) und Pili (Mora *et al.*, 2005) eine Bindung an Wirtsgewebe vermitteln. Am besten untersucht sind jedoch die Fibronektin-bindenden Proteine SfbI und M1 der Gruppe A Streptokokken. Für beide Proteine ist die Interaktion mit Epithelzellen umfassend beschrieben und untersucht. Im Gegensatz zum Epithel wurde die Rolle des Blutbahn-auskleidenden Endothel bei der Invadierung der Pathogene bisher kaum untersucht. 2003 konnten Rohde *et al.* zeigen, dass das SfbI-Protein auch in der Lage ist, Endothelzellen zu invadieren. Vermutlich kommt diese Funktion jedoch *in vivo* nicht zum Tragen, da SfbI unter niedrigem Sauerstoff- und hohem CO<sub>2</sub>-Gehalt im Blut nicht exprimiert wird (Gibson *et al.*, 1995). Streptokokken vom Serotyp M3 stehen in engem Zusammenhang mit einem invasiven Krankheitsverlauf, weisen jedoch weder das SfbI-Protein, noch das M1-Protein auf. Für diesen Serotyp ist bisher noch kein Faktor beschrieben, der in der Stärke Invasion vermittelt, wie sie bei M3 GAS auf Endothelzellen beschrieben ist. Das M3-Protein ist zwar bekannt für seine antiphagozytischen Eigenschaften und besitzt darüber hinaus auch adhäsive Fähigkeiten, jedoch sind diese sehr gering. Als weiterer Virulenzfaktor von M3 GAS werden SpyCep invasive Eigenschaften zugeschrieben. Ergebnisse von Kaur *et al.* (2010) zeigen die Aufnahme von rekombinantem SpyCep-Protein in HUVEC-Zellen, wo es dann zur Kolokalisation mit Endosomen und Lysosomen kommt. Es wird jedoch die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei SpyCep nicht um ein kovalent Oberflächen-gebundenes Protein handelt. Somit stellt auch SpyCep kein Invasin dar, dass *S. pyogenes* direkten Zugang zu Endothelzellen verschaffen könnte.

In dieser Arbeit konnte mit FbaB zum ersten Mal ein oberflächenassoziiertes Protein von M3 GAS als potentes Invasin für Endothelzellen nachgewiesen werden. Durch einen Abgleich mit Datenbanken stellte sich heraus, dass das *fbaB*-Gen ausschließlich in allen bisher sequenzierten M3, M18 und M5 Serotypen vorhanden ist. Des Weiteren ist die Nukleotidsequenz bei allen Stämmen zu 100% identisch und variiert ausschließlich in der Anzahl der Fibronektin-bindenden *repeats*. Dies, und die Tatsache, dass die FbaB-Expression in engem Zusammenhang mit dem STSS steht (Terao *et al.*, 2002), machen FbaB zu einem wichtigen Virulenzfaktor für schwere Streptokokkeninfektionen vom M3-Serotyp, die mit Gewebsschädigungen und toxischem Schock einher gehen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl rekombinantes Protein, gekoppelt an Latex-Partikel, als auch heterolog FbaB-exprimierende Stämme eine Internalisierung in Endothelzellen auslösen. Der Aufnahmeprozess läuft dabei äußerst schnell ab und Bakterien können so innerhalb von 2 Minuten aufgenommen werden. Ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei FbaB um das Hauptinvasin von M3 GAS handelt, zeigen Invasionsversuche mit *S. pyogenes* WT und der entsprechenden *fbaB*-Mutante. Obwohl die Mutante immer noch invasives Potential hat, zeigt sie doch ein über 50% reduziertes Invasionspotential im Vergleich zum Wildtyp. Da es sich bei M3 um einen der aggressivsten und höchst pathogenen Serotypen von GAS handelt, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Serotyp im Laufe seiner Evolution mehrere Invasine entwickelt hat. Dies würde bedeuten, dass im Falle einer Mutation, die den Verlust eines Invasins zur Folge hat, noch ein Repertoire an weiteren Invasion-vermittelnden Virulenzfaktoren zur Verfügung stünde. Der Grund dafür, dass nach Verlust eines einzigen Faktors die Invasionsfähigkeit nicht vollständig verloren geht, könnte darin liegen, dass M3 GAS noch ein Repertoire an weiteren Invasion-vermittelnden Virulenzfaktoren (M3-Protein, SpyCep, etc.) zur Verfügung steht.

Die meisten pathogenen Bakterien neigen dazu, bestimmte Gewebe zu infizieren. Gruppe A Streptokokken infizieren mit Vorliebe die Haut und die Schleimhäute der oberen Atemwege. *S. pyogenes* vom Serotyp M3 kann unterschiedliche Krankheiten auslösen, von der Pharyngitis über eine Sepsis bis hin zur rheumatischen Endokarditis. Da das Bakterium dabei zu verschiedenen Zeiten in Kontakt mit unterschiedlichen Geweben kommt, ist zu vermuten, dass Gruppe A Streptokokken während der unterschiedlichen Phasen einer Infektion auch unterschiedliche Virulenzfaktoren exprimieren. Es ist denkbar, dass auch für das Endothel ein spezifisches Oberflächenprotein entwickelt wurde, welches den Kokken den Zutritt zu diesem Gewebetyp sichern soll. FbaB konnte in dieser Arbeit als ein potentes Invasin für Endothelzellen identifiziert werden. Des Weiteren sind für dieses Protein bereits adhäsive Eigenschaften auf Epithelzellen beschrieben (Terao *et al.*, 2002). Erste Tropismusversuche, die in Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführt wurden, deuten

darauf hin, dass FbaB ein Endothel-spezifisches Invasin ist: sowohl Endothel, als auch Epithelzellen wurden im gleichen Ansatz mit heterolog FbaB-exprimierenden *S. agalactiae* infiziert. Es zeigte sich, dass diese Kokken Endothelzellen 9-mal stärker invadieren als Epithelzellen (Daten nicht gezeigt). Dies spiegelt sich auch in den Analysen von Terao *et al.* wieder.

Aufgrund der Struktur und der Fibronectin-bindenden Eigenschaften von FbaB liegt die Vermutung nahe, dass der Kontakt zum Endothel über das Fibronectin der extrazellulären Matrix hergestellt wird. Durch Bindungsassays mit löslichem und immobilisiertem Fibronectin konnten die Fibronectin-bindenden Eigenschaften von FbaB bestätigt werden. Frühere Arbeiten zeigten, dass die Fibronectin-bindenden *repeats* ausreichend sind für die Bindung an das Matrixprotein (S. Amelung, Diplomarbeit). Wie für das ebenfalls Fibronectin-bindende SfbI bereits bekannt, konnte auch für FbaB die Fibronectinbindung auf das 30kDa Subfragment beschränkt werden. Allerdings scheint das FbaB nicht wie SfbI über eine weitere Region (*spacer*) zu verfügen, die die Bindung an das 45 kDa Fibronectin-Subfragment vermittelt. Untersuchungen der Bindung von FbaB an Fibronectin im lebenden System ergab eine erhöhte Fähigkeit des FbaB-exprimierenden GBS Stammes an radioaktiv markiertes lösliches Fibronectin zu binden im Vergleich zum Ursprungstamm M3 GAS A60. Dieses Ergebnis ist damit zu erklären, dass es im heterologen System durch konstitutive Expression von FbaB zu einer Überexpression des Proteins im Vergleich zu GAS A60 kommt.

Für die SfbI vermittelte Invasion ist die Bindung an Fibronectin essentiell. Dies konnte 2000 von Talay *et al.* gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit lieferte erste Hinweise auf die Rolle von Fibronectin bei der FbaB-vermittelten Invasion. Durch Präinkubation mit dem 30 kDa Fibronectin Subfragments ließ sich die FbaB-vermittelte Invasion zu 64% inhibieren. Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um die Notwendigkeit von Fibronectin für FbaB eindeutig zu klären. Denn obwohl nach der Präinkubation mit dem Subfragment alle Fibronectinbindungsstellen der FbaB-Moleküle auf der Oberfläche der GBS abgedeckt sein sollten, kam es noch zu einer Restaktivität von immerhin 36%. Offen bleibt an dieser Stelle, ob FbaB *in vivo* für die Invasion in Endothelzellen an gelöstes Fibronectin aus dem Plasma bindet, oder an immobilisiertes, zellgebundenes Fibronectin. Da Endothelzellen Fibronectin selber produzieren, ist es nahezu unmöglich einen Fibronectin-freien *in vitro* Versuch zu konstruieren. A549 Zellen (humane karzinome Lungenepithelzellen) jedoch können kein endogenes Fibronectin synthetisieren. Dadurch lässt sich die Fibronectinmenge im Invasionsassay durch Zugabe von exogenem Fibronectin regulieren. In früheren Versuchen stellte sich heraus, dass es zu einer Fibronectin-abhängigen Invasion in A549 Zellen durch

FbaB kommt. Fibronectin scheint also bei der FbaB-vermittelten Invasion durchaus eine Rolle zu spielen.

Während der SfbI- und M1-vermittelten Invasion, die in beiden Fällen über Fibronectin abläuft, kommt es zu einer Bindung des Fibronectins an Integrine (Ozeri *et al.*, 1998). In beiden Fällen werden dadurch Signalwege in den Zellen ausgelöst, die zur Aufnahme der Bakterien führen. Es ist anzunehmen, dass es auch im Falle von FbaB zu einer Bindung an Integrine kommt, die dadurch intrazelluläre Signalwege zur Aufnahme der Bakterien auslösen. Da FbaB drei putative Integrinbindungsstellen aufweist (DGE, RGD, IDG), besteht die Möglichkeit, dass FbaB über diese Bindestellen direkt an die Integrine binden kann. Bisherige Versuche, die Beteiligung von  $\beta_1$  Integrinen eindeutig nachzuweisen, waren leider erfolglos. Es bleibt also herauszufinden, (i) ob FbaB direkt an Integrine binden kann, (ii) über welches der drei Integrinmotive die Bindung erfolgt und (iii) um welche Integrine es sich dabei handelt.

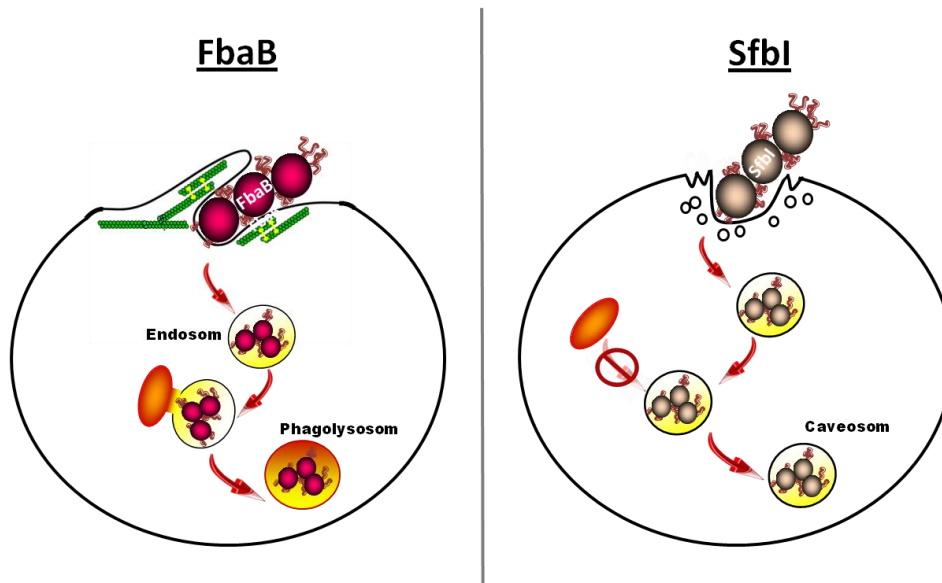
Die Aufnahme von Pathogenen in eine Wirtszelle kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Im Fall von *Salmonella* und *Shigella* werden Bakterien über Membranausstülpungen aufgenommen (Zhou & Galan 2001), im Fall von *E. coli* K1 dagegen über Membraneinstülpungen (Sukumaran *et al.*, 2001). In den meisten Fällen ist das Aktinzytoskelett maßgeblich an der Aufnahme von pathogenen Bakterien beteiligt. Bei der SfbI-vermittelten Invasion kommt es nach dem Integrin-*clustering* zur Rekrutierung von Caveolae, die miteinander verschmelzen und die SfbI-tragenden Bakterien in Caveosomen aufnehmen (Rohde *et al.*, 2003). *S. pyogenes* vom Serotyp M3 werden, ähnlich dem Serotyp M1, durch Ausbildung von Membranprotrusionen nach Anheften der Bakterien an die Zellmembran aufgenommen (Nerlich *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von FbaB gekoppelten Latexpartikeln und von FbaB-exprimierenden GBS zeigen, wie die Zelle Lamellipodien-artige Fortsätze bildet, die die Partikel bzw. Bakterien immer weiter umschließen, bis diese von der Zelle aufgenommen sind. In dieser Arbeit konnte so zum ersten Mal ein Oberflächenprotein von M3 GAS ermittelt werden, das nicht nur ein starkes Invasin ist, sondern auch den Aufnahmemechanismus vermittelt, den M3 GAS zum Eintritt in die Zelle nutzt. Sowohl SfbI und FbaB binden an Fibronectin, lösen aber durch ihre Adhäsion an die Wirtsoberfläche unterschiedliche Aufnahmemechanismen aus. Des Weiteren unterscheiden sich auch die intrazellulären Vesikel, in denen sich SfbI, bzw. FbaB tragende Bakterien nach der Aufnahme befinden (Abb. 5.1). SfbI verbleibt nach der Aufnahme in Caveolin-1 tragenden Vesikeln, sogenannte Caveosomen, die nicht mit Lysosomen fusionieren und so das Überleben der Bakterien sichern. FbaB befindet sich wenige Minuten nach der Aufnahme in EEA1-tragenden Vesikeln, die im weiteren Verlauf mit Lysosomen verschmelzen (Abb 5.1). Auch M3 GAS



steuern diese endozytische Aufnahme an (Talay, unpublizierte Daten). M3 GAS kann nach einer gewissen Verweildauer in der Zelle und nach Fusion mit den Lysosomen wieder unbeschadet aus der Zelle entkommen. Die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass FbaB die Invasion in Endothelzellen vermittelt und den gleichen endozytischen Weg ansteuert, wie er auch von M3 GAS genutzt wird. Jedoch besitzt FbaB nicht die Fähigkeit, *S. agalactiae* das Überleben im Phagolysosomen und die Flucht aus der Zelle zu ermöglichen. Die Tatsache, dass die Nachweisbarkeit von FbaB auf der Oberfläche von Latexpartikeln mit fortschreitender Infektionsdauer nachlässt, spricht dafür, dass das Protein in den Lysosomen abgebaut wird, oder strukturell so verändert wird, dass es für die Antikörper nicht mehr erkennbar ist. M3 GAS verändert den Phänotyp von Endothelzellen nach 60 Minuten in einer Weise, dass es *in vitro* zu einer völligen Depolymerisation von Stressfasern, einer Vakuolisierung der Zelle und zur Kontraktion des Zytoplasmas unter Erhaltung der Fokalkontakte kommt (Talay, unpublizierte Daten). Diese Veränderungen der zellulären Strukturen konnten bei einer FbaB-vermittelten Invasion nicht beobachtet werden. Stattdessen ließ sich auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen ein Zerfall der FbaB-exprimierenden GBS beobachten. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass FbaB auf der Oberfläche von M3 GAS einzig für die Invasion verantwortlich ist und ansonsten keine erkennbare biologische Funktion besitzt.

Die Grundlage für die Internalisierung von Bakterien durch Zellen ist die Anregung verschiedenster intrazellulärer Signalwege, die eine Neuordnung des Aktinzytoskeletts steuern und somit eine Aufnahme der Bakterien ermöglichen.

Von zentraler Bedeutung für die FbaB-vermittelte Aufnahme ist das Vorliegen von aktivem Rac1. Als Mitglied der Familie der Rho GTPasen kann Rac1 in inaktiver GDP-gebundener Form, oder in aktiver, GTP-gebundener Form vorliegen. Aktives Rac1 leitet Signale von einem Rezeptor zu einem Effektor und übernimmt somit eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Zelle. Faktoren, die an dem Austausch von GDP zu GTP und somit an Aktivierung bzw. Deaktivierung der Rho GTPasen beteiligt sind, sind zum einen *guanin nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs), welche die Dissoziation von GDP und die Bindung von *guanin nucleotide exchange* Faktoren (GEF) verhindern. Darüber hinaus modulieren sie die Zytosol/Membranlokalisation der GTPasen. Durch den von GEFs katalysierten Austausch von GDP gegen GTP kann die GTPase in den aktiven Zustand versetzt werden. *GTPase-activating proteins* (GAPs) wiederum stimulieren die niedrige, intrinsische GTPase-Aktivität. Dies führt dazu, dass die GTPase in ihren GDP-gebundenen, inaktiven Zustand wechselt (Narumiya 1996; Lamarche & Hall 1994).



**Abbildung 5.1: Vergleich der FbaB- und SfbI-vermittelten Invasionswege.** FbaB exprimierende Streptokokken werden von Endothelzellen über Membranprotrusionen mittels *zipper* Mechanismus aufgenommen und folgen dem klassischen endozytischen Weg über Endosomen und Lysosomen zum Phagolysosom. SfbI tragende Streptokokken werden von Epithelzellen über Caveolae aufgenommen und verbleiben intrazellulär in Caveosomen, welche nicht mit Lysosomen fusionieren.

Bereits 2001 konnten Cywes und Wessels zeigen, dass es während der Internalisierung von M3 *S. pyogenes* zu einer Kolokalisation von Rac1 am Adhäsionsort der Bakterien kommt. Eine darauffolgende Aktin Polymerisierung und die Öffnung von intrazellulären *junctions* ermöglichen die parazelluläre Translokation von M3 Gruppe A Streptokokken durch das Epithel-Zellmodell. Es gibt Berichte, wonach die Aktivierung von Rac1 eingeleitet werden kann durch Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und Src-Kinasen (Welch *et al.*, 2003; Timpson *et al.*, 2001). Für die Internalisierung von M3 GAS in Endothelzellen ist die Aktivierung von Rac1 essentiell und führt zu einer Rekrutierung des Arp2/3 Komplexes, der an der Aktinpolymerisierung maßgeblich beteiligt ist (Nerlich *et al.*, 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die beobachtete Beteiligung von Rac1 während der Internalisierung von M3 GAS von dem Oberflächenprotein FbaB ausgeht. Es ist das einzig bisher bekannte potente Invasin von M3 GAS für Endothel und die zellulären Vorgänge die bei der FbaB-vermittelten Aufnahme ausgelöst werden, sind mit denen von M3 GAS nahezu identisch. FbaB verursacht die Rekrutierung und Aktivierung von Rac1, einer GTPase die in Verbindung steht mit der Ausbildung von Lamellipodien-artigen Membranausstülpungen und damit einhergehenden Veränderungen des Aktinzytoskeletts (Hall *et al.*, 2002). Genau diese zellmorphologischen Veränderungen werden auch bei der FbaB-vermittelten Aufnahme

beobachtet. Hier kommt es zu einer Akkumulation von F-Aktin um internalisierende FbaB-positive Bakterien, die wiederum verbunden ist mit einer Akkumulation von Rac1. Rasterelektronenmikroskopisch sind diese zellulären Vorgänge letztlich als Membranausstülpungen sichtbar, die sich dicht über adhärente Bakterien legen. Man spricht in diesem Fall von einem *zipper* Mechanismus. Dieser setzt sich solange fort, bis die gesamte Kokkenkette von Zellmembran umgeben ist und somit aufgenommen werden kann.

Nicht nur für Streptokokken ist ein Zusammenhang zwischen deren Internalisierung und der Beteiligung von Rho GTPasen beschrieben. So ist für *Salmonella typhimurium* beschrieben, dass diese Bakterien einen Aktivator für Rho-GTPasen exprimieren und nach Zellkontakt in die Wirtszelle injizieren, was wiederum die Bildung von Membranprotrusionen induziert (Hardt *et al.*, 1998). *Yersinia pseudotuberculosis* rekrutiert und aktiviert Rac1 nach Bindung von *Yersinia* an  $\beta_1$  Integrine (Alrutz *et al.*, 2001). Und auch für *Chlamydia trachomatis* konnte eine Aktivierung von Rac1 und des Arp2/3 Komplexes nach Adhäsion der Bakterien nachgewiesen werden, was zu zytoskelettalen Veränderung und zur Aufnahme der Bakterien führt (Carabeo *et al.*, 2007).

Neben Rac1 wird auch häufig die Beteiligung der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) an der Internalisierung von Pathogenen beobachtet. Beispielsweise wird die Notwendigkeit von PI3K für die Invasin- und YadA-vermittelte Aufnahme von *Y. pseudotuberculosis* beschrieben (Alrutz *et al.*, 1998). Auch für SfbI- oder M1-positive Gruppe A Streptokokken konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der PI3K für die Internalisierung notwendig ist (Purushothaman *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). Hingegen zeigten Versuche mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 keine markanten Veränderungen im Invasionspotential von M3 *S. pyogenes* (Nerlich *et al.*, 2009). Die Invasionsrate sank hier um nur ca. 20%. Dies erscheint zunächst kontrovers zu den Ergebnissen, die in dieser Arbeit gewonnen wurden. Denn im Gegensatz zu den Versuchen mit M3 *S. pyogenes* sank die Invasion von FbaB-exprimierenden *S. agalactiae* auf immerhin 65% unter der Verwendung von LY294002.

Die Funktion der PI3K besteht darin, die Phosphorylierung von Phosphoinositiden (PI) an der dritten Position des Inositolrings zu katalysieren. Klasse I PI3K katalysieren die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat ( $\text{PI}[4,5]\text{P}_2$ ) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat ( $\text{PI}[3,4,5]\text{P}_3$ ) an der inneren Seite der Zellmembran (Takenawa & Itoh 2001). Die Akkumulation von  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  wurde dabei nur vor der Phase der Abschnürung der Phagosomen von der Zellmembran beobachtet (Marshall *et al.*, 2001). PI3K der Klasse III hingegen katalysieren die Phosphorylierung von PI zu  $\text{PI}(3)\text{P}$ .  $\text{PI}(3)\text{P}$  wiederum dient dem Markerprotein EEA1 als Andockstelle an Phagosomen.  $\text{PI}(3)\text{P}$  stellt somit eine wichtige Komponente für die weitere Reifung der Phagosomen zu Endosomen

und Lysosomen dar. Der Inhibitor LY294002 wirkt auf alle PI3K gleichermaßen. Da die Klasse I PI3K nur die Phosphorylierung von  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  zu  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  katalysiert, liegt die Vermutung nahe, dass PIP3 an der Internalisierung zwar beteiligt ist, aber nicht essentiell ist. Dies ist vereinbar mit den Beobachtungen, die für die FbaB-vermittelte Aufnahme gemacht werden konnten. So inhibiert der Einsatz von LY294002 die Invasion, aber blockiert sie nicht vollständig. Da M3 GAS noch über andere (identifizierte oder unidentifizierte) Invasionsvermittelnde Virulenzfaktoren verfügt, ist es denkbar, dass eine Inhibition der PI3K durch andere bakterielle Faktoren ausgeglichen wird, die einen PI3K-unabhängigen Internalisierung ansteuern. Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der PI3K Inhibition im Falle von M3 GAS und von der FbaB-vermittelten Invasion könnten auch im Transzytosepotential von M3 GAS liegen. Wie bereits erwähnt, haben M3 GAS das Potenzial, Endothelzellen nach zellulärer Passage über Endosomen und Lysosomen wieder zu verlassen. Es könnte jedoch sein, dass es durch Inhibition der Klasse I PI3K zu einer zu einer reduzierten Internalisierung von M3 GAS kommt. Da jedoch (durch Inhibierung der Klasse III PI3K) die Reifung von Phagosomen zu Phagolysosomen nicht mehr stattfinden kann, können die Streptokokken die Zelle nicht mehr *via* Exozytose verlassen. Dies wiederum würde zu einer Anhäufung von intrazellulären Kokken führen. Somit wäre die Anzahl von intrazellulären Kokken bei LY294002-behandelten Zellen der von unbehandelten Zellen sehr ähnlich und der Effekt der Inhibierung der Kinase nicht zu erkennen. Die Inhibierung der Kinasen lässt sich aber anhand der intrazellulären Lokalisation der Bakterien nachweisen. Sowohl M3 GAS und FbaB-exprimierende GBS beladene Phagosomen sind nach der Behandlung mit LY294002 nicht mehr in der Lage zu Phagolysosomen zu reifen. Dies konnte durch Fluoreszenzmarkierung des lysosomalen Markerproteins Lamp1 und der intrazellulären Bakterien bestätigt werden.

Sowohl Rac1, als auch PI3K spielen bei der Ausbildung von Membranprotrusionen eine Rolle. Dies konnte in vielfachen Studien gezeigt werden. Offen bleibt dabei aber der genaue Zusammenhang zwischen Rac1 und PI3K, insbesondere die Frage, ob Rac1 direkt oder indirekt abhängig ist von Klasse I PI3K, oder umgekehrt. Auch in der Literatur wird diese Frage kontrovers diskutiert. Neuste Studien zur Regulation der Motilität von Neutrophilen durch PI3K-Aktivität zeigten, dass PI3K die Rac-vermittelte Polymerisation von F-Aktin unterstützt (Yoo et al., 2010). Beamiller et al. (2009) hingegen konnten zeigen, dass Rac1 in Makrophagen trotz der Inhibition der PI3-Kinase aktiviert wird. Inoue und Meyer stellten 2008 ein AND-gate Modell zur Zellmigration vor, das erklärt wie PI3K-abhängige und PI3K-unabhängige Signalwege die Aktindynamik innerhalb derselben Zelle regulieren können. Die Beobachtung, dass die Aktivität der PI3K für die Internalisierung von M3 GAS nicht notwendig ist, macht den Aufnahmeprozess von M3 *S. pyogenes* zu etwas Besonderem.

Denn die Rezeptor-vermittelten Invasion sowohl von *Staphylococcus aureus*, *Y. pseudotuberculosis*, als auch von SfbI- und M1-exprimierenden Gruppe A Streptokokken beruhen auf der Aktivierung der PI3K (Horn *et al.*, 2008; Eitel *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

Da die Invasion von M3 *S. pyogenes* in Endothelzellen von Src-Kinasen abhängig ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dies auch für die FbaB-vermittelte Aufnahme zutrifft. Die Familie der Src-Kinasen gehört zu den Protein-Tyrosin Kinasen. Hierbei handelt es sich um membranassoziierte Enzyme, die spezifisch Substrate erkennen, binden und eine Phosphatgruppe an den Tyrosinrest des Zielproteins transferieren (Pawson 2004; Martin 2001). Selbst werden die Src-Kinasen ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert. Dadurch werden intramolekulare Interaktionen kontrolliert, die die Kinasen entweder in einer geschlossenen, inaktiven Form belassen, oder einen Wechsel zur aktiven Form erlauben (Boggon & Eck 2004). Die Aktivität der Src-Kinasen als Antwort auf interne oder externe Reize ist unter anderem wichtig für die Migration, die Polarität oder die Teilung der Zelle, aber auch für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Rho GTPasen und die Familie der Src-Kinasen können sich gegenseitig beeinflussen oder parallel zueinander agieren. So können zum Beispiel enteropathogene *E. coli* und *Cryptosporidium* die Src-Kinasen nutzen um eine Aktinpolymerisierung einzuleiten (Münter *et al.*, 2006). Auch bei der Internalisierung von *Y. pseudotuberculosis* und *S. aureus* konnte eine Beteiligung der Src-Kinase nachgewiesen werden (Eitel *et al.*, 2005; Agerer *et al.*, 2003). Eine Blockade der Src-Kinase durch den Inhibitor PP2 reduzierte die Internalisierung von M3 GAS in Endothelzellen um ca. 80% (Talay, unpublizierte Daten). Für die FbaB-vermittelte Aufnahme konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden. Die Internalisierung von FbaB-exprimierenden Bakterien ließ sich hier nur um ca. 45% inhibieren. Allerdings muss an dieser Stelle darauf verwiesen werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Konzentration des Inhibitors PP2 nur der Hälfte der Konzentration entspricht, die für die Inhibitionsinfektionen mit M3 GAS verwendet wurden. Darüber hinaus kommt es bei der heterologen Expression – wie oben schon erwähnt – zu einer stärkeren Anreicherung von FbaB auf der Oberfläche von GBS verglichen mit dem Wildtyp-M3 GAS, was wiederum eine verstärkte Aktivierung der Kinase und damit einhergehend auch eine geringe Sensitivität gegenüber dem Inhibitor nach sich ziehen könnte. Für die Untersuchung der Invasion von *Y. pseudotuberculosis* wurde sogar 5-mal soviel Inhibitor eingesetzt. Da die Invasion abhängig von der Konzentration des eingesetzten PP2 inhibiert wurde, ist es durchaus denkbar, dass auch die FbaB-vermittelte Invasion durch Erhöhung des Inhibitors noch weiter gehemmt werden kann. Eine Möglichkeit der Bestimmung der Src-Kinase Abhängigkeit bei der FbaB-vermittelten Invasion besteht in der Transfektion von Endothelzellen mit einer dominant negativen Form der Src-Kinase, wie es im Falle von *Y. pseudotuberculosis* auch gezeigt wurde (Eitel *et al.*, 2005).

Eine weitere Kinase, die in Zusammenhang mit dem Aktinzytoskelett und der Src-Kinase steht, ist die Proteinkinase C (PKC). Die herkömmlichen PKC's werden durch Calcium-Ionen und Diacylglycerol (DAG) aktiviert, aber auch durch Phosphatidylserin (PS). In seiner inaktiven Form befindet sich die PKC im Zytosol und wird erst nach der Aktivierung zur Zellmembran translokiert. Dieser Kinase konnte eine Beteiligung am Zellwachstum, an der Zelldifferenzierung und an der Zellmigration nachgewiesen werden. Darüber hinaus gelten sie als wichtige Regulatoren zytoskelettaler Funktionen (Keenan & Kelleher 1998). 2002 konnten Brandt *et al.* einen Zusammenhang zwischen PKC und Src-Kinasen herstellen (siehe auch Abbildung 5.2). Die Autoren konnten eine PKC abhängige Aktivierung der Src-Kinase zeigen, die essentiell ist für die Umstrukturierung des Aktins. Die Rolle der PKC bei der Internalisierung von Pathogenen wurde bisher kaum untersucht. Von Sukumaran und Prasadarao (2002) wird der PKC eine wichtige Rolle während der Internalisierung von *E. coli* K1 über Caveolae in Endothelzellen zugesprochen. Des Weiteren induzieren die Oberflächenproteine YadA und Inv von *Y. pseudotuberculosis* die Aktivität der PKC, welche an der Internalisierung des Bakteriums beteiligt ist (Uliczka *et al.*, 2009). Eigene Untersuchungen der Arbeitsgruppe deuten ebenfalls auf eine wichtige Rolle der PKC bei der Internalisierung von M3 GAS in Endothelzellen hin. Die Blockade der PKC mit dem Inhibitor Calphostin C führte im Falle von M3 GAS zu einer Reduktion der Invasion um ca. 80%. Zu einer vollständigen Blockade der Invasion durch M3 GAS führte eine Präzipitation des intrazellulären Calciums ( $\text{Ca}^{2+}_{[i]}$ ) mit dem Chelator BAPTA-AM. Dieses Ergebnis ist zu erklären mit der Abhängigkeit der PKC von  $\text{Ca}^{2+}_{[i]}$  (Talay, unpublizierte Daten). Auch die FbaB-vermittelte Invasion ist ein deutlich Calcium-abhängiger Prozess. Die Blockade von intrazellulärem Calcium mit BAPTA-AM führte ebenfalls zu einer Inhibition der Invasion um ca. 90% und auch eine Beteiligung der PKC an der FbaB-vermittelten Invasion ließ sich bestätigen. Chemische Inhibition der PKC durch ihren spezifischen Inhibitor Calphostin senkte die Invasionsrate FbaB-exprimierender Kokken um 60%. Die Abweichungen in den Ergebnissen der PKC, die mit M3 GAS und mit FbaB gemacht wurden, liegen bei knapp 20%. Diese Diskrepanz ließe sich mit der Ausstattung von Oberflächen-Virulenzfaktoren erklären, die sich auf der Oberfläche von M3 GAS sicherlich von denen der Gruppe B Streptokokken unterscheiden. Grundsätzlich gelten zwar auch Gruppe B Streptokokken als humane Pathogene, aber Kontrollversuche dieser Arbeit zeigten, dass der eingesetzte GBS Stamm kein Invasionspotential in Endothelzellen hat. M3 GAS hingegen ist ein hoch invasiver Stamm, der ohne FbaB zwar noch fähig ist, Endothelzellen zu invadieren, jedoch mit geschwächtem Potential. M3 GAS muss also noch andere Virulenzfaktoren exprimieren, die ihm eine Invasion ermöglichen, welche dann aber wiederum unabhängig von der Aktivität der PKC sind. Der eingesetzte GBS Stamm, besitzt nur FbaB als potentes Invasin.

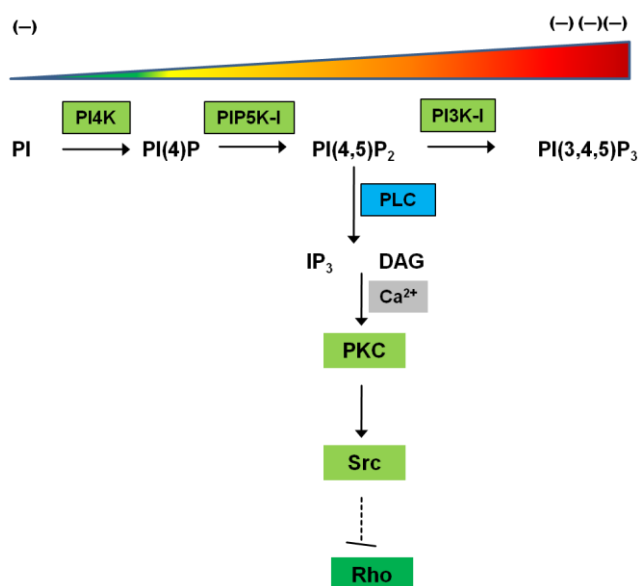
Vermutlich ist daher die direkt von FbaB-vermittelte Invasion (von M3 *S. pyogenes*) zu 60% PKC abhängig.

Die Phospholipase C ist ein weiteres Enzym, das die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wichtig ist und damit oberhalb der PKC steht. Die Lipase kann, über die Interaktion mit PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, hierarchisch nach der Klasse I PI3-Kinase aktiviert werden (Rameh *et al.*, 1998; Falasca *et al.*, 1998). So wird sie in der Plasmamembran verankert und bringt sich in die Nähe ihres Substrates: PI(4,5)P<sub>2</sub> (Falasca *et al.*, 1998). Dieses wird gespalten in Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und DAG. IP<sub>3</sub> bewirkt durch seine Interaktion mit dem endoplasmatischen Retikulum die Freisetzung von intrazellulärem Calcium. Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> und DAG bewirken anschließend die Aktivierung der PKC (Abb. 5.2). Die PLC wird ubiquitär exprimiert und kann durch eine Vielzahl von Rezeptoren aktiviert werden, wie z.B. Integrinen. Unter anderem wird ihr eine Beteiligung an der Neuordnung des Aktinzytoskeletts zugesprochen. Für die Internalisierung von *Y. pseudotuberculosis* und *E. coli* K1 konnte die Notwendigkeit der PLC bereits gezeigt werden (Uliczka *et al.*, 2009; Sukumaran *et al.*, 2003). Weitere unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe belegen eine Beteiligung der PLC auch an der Internalisierung von M3 *S. pyogenes* (Talay, unveröffentlichte Daten). Die Inhibition der PLC mit dem synthetischen Inhibitor Edelfosine führte zu einer um 80% verringerten Invasion im Vergleich zur Kontrolle. Ähnlich wie bei der Proteinkinase C führt auch der Einsatz von Edelfosine bei der FbaB-vermittelten Invasion „nur“ zu einer Reduktion der Invasion um 65%. Auch diese Diskrepanz im Inhibitionspotential zwischen M3 *S. pyogenes* und dessen Oberflächenprotein FbaB, ließe sich mit der gleichen Theorie erklären, wie auch schon bei der PKC.

Vergleicht man die Enzyme und Lipide, die an der FbaB-vermittelten Internalisierung und an der Invasion von M3 GAS beteiligt sind, fallen sofort Parallelen zur klassischen Phagozytose auf. Zu den klassisch phagozytierenden Zellen gehören die Makrophagen, die dendritischen Zellen oder die Leukozyten. Die phagozytischen Wege sind sehr komplex. Am besten sind bisher die Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose (Typ I Phagozytose) und die Komplement vermittelte Phagozytose (Typ II Phagozytose) verstanden. Die Internalisierung der Streptokokken in das Endothel ist am vergleichbarsten mit der Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose. An dieser sind viele regulatorische Signalmoleküle beteiligt. Dazu gehören z.B. Protein-Tyrosin Kinasen, sowie Rac1 und Cdc42. Die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 induziert die Polymerisierung von F-Aktin über WASP und den Arp2/3 Komplex. Dies resultiert in der Ausbildung von F-Aktin reichen Lamellipodien, welche die zu phagozytierenden Partikel umgeben. Eben diese Moleküle und Vorgänge sind auch an der Aufnahme von Gruppe A Streptokokken in Endothelzellen beteiligt. Auch die PI3-Kinase ist während des Phagozytoseprozess wichtig: sie kontrolliert während der Bildung des

Phagosomes die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran. Die Typ II Phagozytose unterscheidet sich zum einen durch das Einsinken von Partikeln in die Zelle und zum anderen durch die Beteiligung der Proteinkinase C anstelle der Protein-Tyrosin Kinasen (Review: Celli & Finlay 2002).

Es wird angenommen, dass Endothelzellen und Blutzellen den gleichen Ursprung besitzen: Hämangioblasten, Vorläuferzellen, die aus dem Mesoderm abstammen und die zu Blutinseln aggregieren (Sabin et al., 1920). Die äußeren Zellen der Blutinseln differenzieren sich zu Endothelzellen, während sich die inneren Zellen zu hämatopoetischen Zellen differenzieren, die sich wiederum zu Blutzellen und Lymphzellen entwickeln (Asahara & Kawamoto 2004). Wenn sich Endothelzellen und Phagozyten also während der Embryogenese aus den gleichen Vorläuferzellen entwickeln, liegt auch die Vermutung nahe, dass beide Zelltypen über ein ähnliches Repertoire an exprimierten Genen besitzen (bspw. PI3K, Rho-GTPasen, PKC).



**Abbildung 5.2: Darstellung der Vorgänge an der Plasmamembran während der Phagozytose.** (Nach Brandt et al., 2002; Steinberg & Grinstein 2008)

Die Arbeitsgruppe um Grinstein untersucht die Rolle von Lipiden bei der Phagozytose und veröffentlichte dazu 2008 ein Übersichtsartikel (Steinberg & Grinstein). Auf der inneren Seite der Zellmembran sind verschiedene Phospholipide zu finden, wie z.B., Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidyl-serin (PS) oder Phosphoinositid (PI). PI bildet dabei einen Anteil von 10% aller Lipide in der Zellmembran. Während der Ausbildung von Lamellipodien-artigen Fortsätzen zur Aufnahme von Partikeln kommt es zur Phosphorylierung von PI über mehrere Schritte zu PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (siehe Abbildung 5.2). Die Phospholipide

tragen erheblich zur Ladung der inneren Seite der Zellmembran bei. Mit Zunahme der Phosphatreste am PI nimmt auch die negative Ladung an der Zellmembran zu. Es wird vermutet, dass die Ladung dazu führt, dass positiv-geladene Rac1 Moleküle zu der Membran rekrutiert werden. Es wird weiterhin vermutet, dass die Zellmembran als flüchtiger GDI-Dissoziationsfaktor (GDF) fungiert und Rac1-GDP so in der Nähe der membrangebundenen GEF(s) hält, die wiederum durch phagozytische Rezeptoren aktiviert werden. Nimmt die

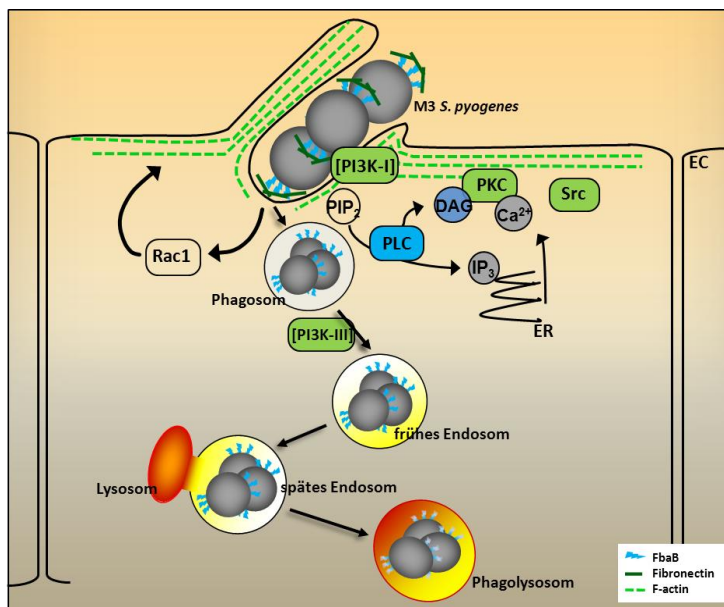


Ladung an der Membran wieder ab (z.B. durch Hydrolyse von  $PI(4,5)P_2$ ), dissoziiert Rac1 von der Membran. Dies würde bedeuten, dass Rac1 allein durch die Nähe zur Zellmembran in den GTP-gebundenen Zustand gelangen kann, an der sich auch die GEFs befinden. Notwendig hierfür wären nur Phosphoinositidkinasen PI4K und PIP5K-I (siehe Abbildung 5.2), die die negative Ladung auf der inneren Seite der Zellmembran ansteigen ließen. Dies wäre auch vereinbar mit den Beobachtungen der FbaB-vermittelten Aufnahme, die nach Anwendung des PI3-Kinasen Inhibitors LY294004 gemacht wurden. Diese Inhibierung führt dazu, dass  $PIP_2$  nicht weiter zu  $PIP_3$  phosphoryliert werden kann. Allein jedoch die Phosphorylierungen bis zum  $PIP_2$  würde in diesem Fall genügen um das Membranpotential zu senken und somit für eine Rekrutierung und Akkumulation des Rac1 zu sorgen, was für die Bildung von lamellipodienartigen Ausstülpungen und der Aufnahme von Partikeln/Bakterien notwendig ist. Die Vorgänge während der Internalisierung von FbaB-tragenden Kokken in Endothelzellen ist also mit dem von Steinberg & Grinstein favorisierten Modell der Phagozytose gut vergleichbar.

Widersprüchlich erscheint zunächst jedoch, dass Streptokokken bekannt sind für die antiphagozytische Wirkung des M-Proteins und der Hyaluronsäurekapsel. Der antiphagozytische Effekt des M Proteins wird auf dessen Fähigkeit zurückgeführt, Fibrinogen und den Komplementfaktor H binden zu können, was zu einer Blockade in der Komplementkaskade führt. Streptokokken besitzen also Mechanismen um der Aufnahme

durch professionell-phagozytierende Zellen zu entgehen. Gleichzeitig (wie im vorliegenden Fall von M3 GAS) leiten sie die Invasion in Endothelzellen gezielt ein.

Zusammenfassend gehen aus dieser Arbeit folgende Ergebnisse hervor: FbaB vermittelt die Invasion in Endothelzellen. Diese Aufnahme wird begleitet von einer Akkumulation von F-Aktin in der Nähe der invadierenden Streptokokken, was zur Bildung von Membranprotrusionen führt, die die FbaB-exprimierenden



**Abbildung 5.3: Übersicht über die zellulären Vorgänge, wie sie während der FbaB-vermittelten Aufnahme vermutet werden.**

Kokken umgeben und mittels eines *zipper* Mechanismus internalisieren. Während der Akkumulation von F-Aktin kommt es außerdem zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Rac1 am Invasionsort. Intrazelluläre Calcium-Ionen sind dabei für die Aufnahme essentiell. Auch der Phospholipase C und der Proteinkinase C konnte bei der FbaB-vermittelten Aufnahme eine Beteiligung zugeordnet werden. Weiterhin wird vermutet, dass auch die Klasse I PI3-Kinase an der Invasion beteiligt ist, aber nicht essentiell ist. Auch eine Beteiligung der Src-Kinase kann durch die gewonnenen Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden und muss noch weiter untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt zur Aufklärung der FbaB-vermittelten Aufnahme bleibt die Aufklärung des zellulären Rezeptors. Zwar konnte Fibronectin als Brückenmolekül identifiziert werden, es bleibt jedoch unklar, ob weitere Integrine an der Aufnahme beteiligt sind, bzw. ob FbaB selbst an Integrine binden kann. In Abbildung 5.3 ist die FbaB-vermittelte Aufnahme schematisch dargestellt.

In dieser Arbeit konnten das invasive Potential von M3 *S. pyogenes* zum ersten Mal einem bestimmten Faktor zugeordnet werden: FbaB. Es konnte das von FbaB-vermittelte intrazelluläre Schicksal ermittelt werden und der Aufnahme-mechanismus geklärt werden. Des Weiteren war es möglich, einige wichtige zelluläre Komponenten zu bestimmen, die an der Aufnahme beteiligt sind.

## 6. Literatur

### A

---

**Agerer F**, Michel A, Ohlsen K, Hauck CR. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):42524-31. Epub 2003 Jul 31.

**Alonso A**, García-del Portillo F. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol*. 2004 Sep;7(3):181-91. Review.

**Alrutz MA**, Isberg RR. Involvement of focal adhesion kinase in invasin-mediated uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13658-63.

**Alrutz MA**, Srivastava A, Wong KW, D'Souza-Schorey C, Tang M, Ch'Ng LE, Snapper SB, Isberg RR. Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. *Mol Microbiol*. 2001 Nov;42(3):689-703.

**Anderson R.G.**, The caveolae membrane system, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 199–225.

**Asahara, T. and Kawamoto, A.** (2004) Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C572-579.

**Ashbaugh CD**, Albertí S, Wessels MR. Molecular analysis of the capsule gene region of group A *Streptococcus*: the *hasAB* genes are sufficient for capsule expression. *J Bacteriol*. 1998 Sep;180(18):4955-9.

**Aziz RK**, Kotb M. 2008. Rise and persistence of global M1T1 clone of *Streptococcus pyogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1511–17

### B

---

**Baorto D.M.**, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der Merwe A, Lublin DM, Abraham SN. Survival of FimH-expressing entero- bacteria in macrophages relies on glycolipid traffic, *Nature* 389 (1997) 636–639.

**Batzloff MR**, Sriprakash KS, Good MF. Vaccine development for group A streptococcus infections and associated disease. *Curr Drug Targets*. 2004 Jan;5(1):57-69.

**Beachey EH**, Simpson WA. The adherence of group A streptococci to oropharyngeal cells: the lipoteichoic acid adhesin and fibronectin receptor. *Infection*. 1982;10(2):107-11.

**Beemiller P**, Zhang Y, Mohan S, Levinsohn E, Gaeta I, Hoppe AD, Swanson JA. A Cdc42 activation cycle coordinated by PI 3-kinase during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell*. 2010 Feb 1;21(3):470-80. Epub 2009 Dec 2.

**Bisno AL, Stevens DL.** Streptococcal infections of skin and soft tissues. *N Engl J Med*. 1996 Jan 25;334(4):240-5

**Boggon TJ, Eck MJ.** Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7918-27.

**Bomse M.**, Alfsen A., HIV Transcytosis Across Epithelial Cell Depends on Galactosyl Ceramide and Lipid Dynamics of the Apical Membrane, ASCB (American Society for Cell Biology), San Francisco, CA, 2000.

**Brandt D**, Gimona M, Hillmann M, Haller H, Mischak H. Protein kinase C induces actin reorganization via a Src- and Rho-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2002 Jun 7;277(23):20903-10. Epub 2002 Mar 29.

**Bryant AE**, Bayer CR, Chen RY, Guth PH, Wallace RJ, Stevens DL. 2005. Vascular dysfunction and ischemic destruction of tissue in *Streptococcus pyogenes* infection: the role of streptolysin O–induced platelet/neutrophil complexes. *J. Infect. Dis.* 192:1014–22

## C

---

**Carapetis JR**, McDonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever. *Lancet.* 2005 Jul 9-15;366(9480):155-68. Review.

**Carabeo RA**, Dooley CA, Grieshaber SS, Hackstadt T. Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion. *Cell Microbiol.* 2007 Sep;9(9):2278-88. Epub 2007 May 15.

**Celli J, Finlay BB.** Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends Microbiol.* 2002 May;10(5):232-7. Review.

**Chiang-Ni C**, Wu JJ. 2008. Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*. *J. Formos. Med. Assoc.* 107:677–85

**Coureuil M**, Mikaty G, Miller F, Lécuyer H, Bernard C, Bourdoulous S, Duménil G, Mège RM, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Nassif X. Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. *Science.* 2009 Jul 3;325(5936):83-7. Epub 2009 Jun 11.

**Courtney HS**, Hasty DL, Li Y, Chiang HC, Thacker JL, Dale JB. Serum opacity factor is a major fibronectin-binding protein and a virulence determinant of M type 2 *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol.* 1999 Apr;32(1):89-98.

**Cossart P**, Pizarro-Cerdá J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 2003 Jan;13(1):23-31. Review.

**Cue D**, Dombek PE, Lam H, and Cleary PP. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect. Immun.*, 66: 4593–4601, 1998.

**Cunningham MW.** Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jul;13(3):470-511.

## D

---

**Delvecchio A**, Currie BJ, McArthur JD, Walker MJ, Sriprakash KS. *Streptococcus pyogenes* prtFII, but not sfbl, sfbII or fbp54, is represented more frequently among invasive-disease isolates of tropical Australia. *Epidemiol Infect.* 2002 Jun;128(3):391-6.

**Dinkla K**, Rohde M, Jansen WT, Kaplan E, Chhatwal GS, Talay SR. Rheumatic fever-associated *Streptococcus pyogenes* isolates aggregate collagen. *J. Clin. Invest*, 111:1905–1912, 2003.

**Dillon HC**, Derrick CW, Dillon MS. M-antigens common to pyoderma and acute glomerulonephritis. *J Infect Dis*. 1974 Sep;130(3):257-67.

**Dombek PE**, Cue D, Sedgewick J, Lam H, Ruschkowski S, Finlay BB, Cleary PP. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol*. 1999 Feb;31(3):859-70.

**Dougherty BA**, van de Rijn I. Molecular characterization of a locus required for hyaluronic acid capsule production in group A streptococci. *J Exp Med*. 1992 May 1;175(5):1291-9.

## E

---

**Edwards RJ**, Taylor GW, Ferguson M, Murray S, Rendell N, Wrigley A, Bai Z, Boyle J, Finney SJ, Jones A, Russell HH, Turner C, Cohen J, Faulkner L, Sriskandan S. Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis*. 2005 Sep 1;192(5):783-90. Epub 2005 Jul 18.

**Eitel J**, Heise T, Thiesen U, Dersch P. Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell Microbiol*. 2005 Jan;7(1):63-77.

## F, G

---

**Falasca M**, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, and Schlessinger J. (1998) Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 17: 414– 422.

**Fratti RA**, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol*. 2001 Aug 6;154(3):631-44.

**Gibson C**, Fogg G, Okada N, Geist RT, Hanski E, Caparon M. Regulation of host cell recognition in *Streptococcus pyogenes*. *Dev Biol Stand*. 1995;85:137-44.

## H

---

**Hall A** and Etienne-Manneville S, Rho GTPases in cellbiology. *Nature*,420:629–635, 2002.

**Hannigan, G.E.**, Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., et al. (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379:91–96.

**Hanski E, Caparon M.** Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 1;89(13):6172-6.

**Hardt WD,** Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galán JE. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*. 1998 May 29;93(5):815-26.

**Horn MP,** Knecht SM, Rushing FL, Birdsong J, Siddall CP, Johnson CM, Abraham TN, Brown A, Volk CB, Gammon K, Bishop DL, McKillip JL, McDowell SA. Simvastatin inhibits *Staphylococcus aureus* host cell invasion through modulation of isoprenoid intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Jul;326(1):135-43. Epub 2008 Apr 3

**Hidalgo-Grass C,** Mishalian I, Dan-Goor M, Belotserkovsky I, Eran Y, et al. 2006. A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. *EMBO J*.25:4628–37

**Hirst RA,** Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW (2004) The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 138:195–201

**Horstmann RD,** Sievertsen HJ, Knobloch J, Fischetti VA. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Mar;85(5):1657-61.

**Horstmann RD,** Sievertsen HJ, Leippe M, Fischetti VA. Role of fibrinogen in complement inhibition by streptococcal M protein. *Infect Immun*. 1992 Dec;60(12):5036-41.

## I

---

**Inoue T,** Meyer T. Synthetic activation of endogenous PI3K and Rac identifies an AND-gate switch for cell polarization and migration. *PLoS One*. 2008 Aug 27;3(8):e3068.

**Irutz MA,** Srivastava A, Wong KW, D'Souza-Schorey C, Tang M, Ch'Ng LE, Snapper SB, Isberg RR. Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. *Mol Microbiol*. 2001 Nov;42(3):689-703.

**Itoh RE,** Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, and Matsuda M (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* 22, 6582-6591.

## J

---

**Jaffe J,** Natanson-Yaron S, Caparon MG, Hanski E. Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol Microbiol*. 1996 Jul;21(2):373-84.

**Jeet Kaur S,** Nerlich A, Bergmann S, Rohde M, Fulde M, Zähler D, Hanski E, Zinkernagel A, Nizet V, Chhatwal G.S, and Talay S.R. The CXC Chemokine-degrading Protease SpyCep of *Streptococcus pyogenes* Promotes Its Uptake into Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2010 Jun 18. [Epub ahead of print]

**Johnson DR,** Stevens DL, Kaplan EL. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis*. 1992 Aug;166(2):374-82.

**Joh, D., Wann, E.R., Kreikemeyer, B., Speziale, P., and Hook, M.** (1999) Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* 18: 211–223.

## K

---

**Kaul R, McGeer A, Low DE, Green K, Schwartz B.** 1997. Population-based surveillance for group A streptococcal necrotizing fasciitis: clinical features, prognostic indicators, and microbiologic analysis of seventy-seven cases. Ontario Group A Streptococcal Study. *Am. J. Med.* 103:18–24

**Keenan C, Kelleher D.** Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal.* 1998 Apr;10(4):225-32. Review.

**Kratovac Z, Manoharan A, Luo F, Lizano S, Bessen DE.** Population genetics and linkage analysis of loci within the FCT region of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol.* 2007 Feb;189(4):1299-310. Epub 2006 Oct 6.

**Kreikemeyer B, Nakata M, Oehmcke S, Gschwendtner C, Normann J, Podbielski A.** *Streptococcus pyogenes* collagen type I-binding Cpa surface protein. Expression profile, binding characteristics, biological functions, and potential clinical impact. *J Biol Chem.* 2005 Sep 30;280(39):33228-39. Epub 2005 Jul 21.

**Kreikemeyer B und Podbielski A,** Molekulare und zelluläre Hintergründe rezidivierender *Streptococcus pyogenes*-Infektionen. *BIOspektrum* 1/05- 11.Jahrgang

## L

---

**Lancefield RC** (1933). "A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 57 (4): 571–95.

**Lamagni TL, Darenberg J, Luca-Harari B, Siljander T, Efstratiou A, Henriques-Normark B, Vuopio-Varkila J, Bouvet A, Creti R, Ekelund K, Koliou M, Reinert RR, Stathi A, Strakova L, Ungureanu V, Schalén C; Strep-EURO Study Group, Jasir A.** Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol.* 2008 Jul;46(7):2359-67. Epub 2008 May 7.

**Lamarche N, Hall A.** GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* 1994 Dec;10(12):436-40. Review.

**Lauer S, VanWye J, Harrison T, McManus H, Samuel BU, Hiller NL, Mohandas N, Haldar K.** Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection, *EMBO J.* 19 (2000) 3556–3564.

**Lizano S, Luo F, Bessen DE.** 2007. Role of streptococcal T antigens in superficial skin infection. *J. Bacteriol.* 189:1426–34

## M

**Marshall JG**, Booth JW, Stambolic V, Mak T, Balla T, Schreiber AD, Meyer T and Grinstein S. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fcγreceptor-mediated phagocytosis. *J. Cell Biol.*, 153:1369–1380, 2001.

**Martin GS**. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jun;2(6):467-75.

**Molinari G, Chhatwal GS**. Streptococcal invasion. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Feb;2(1):56-61.

**Mora M**, Bensi G, Capo S, Falugi F, Zingaretti C, et al. 2005. Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15641–46

**Mordue DG**, Desai N, Dustin M, Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 190 (1999) 1783–1792.

**Moses AE**, Wessels MR, Zalzman K, Albertí S, Natanson-Yaron S, Menes T, Hanski E. Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A *Streptococcus*. *Infect Immun.* 1997 Jan;65(1):64-71.

**Miyamoto, S.**, Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K., and Yamada, K.M. (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 131: 791–805.

**Münter S**, Way M, Frischknecht F. Signaling during pathogen infection. *Sci STKE.* 2006 May 16;2006(335):re5.

## N

**Nakata M**, Podbielski A, Kreikemeyer B. MsmR, a specific positive regulator of the *Streptococcus pyogenes* FCT pathogenicity region and cytolysin-mediated translocation system genes. *Mol Microbiol.* 2005 Aug;57(3):786-803.

**Narumiya S**. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem.* 1996 Aug;120(2):215-28. Review.

**Natanson S**, Sela S, Moses AE, Musser JM, Caparon MG, Hanski E. Distribution of fibronectin-binding proteins among group A streptococci of different M types. *J Infect Dis.* 1995 Apr;171(4):871-8.

**Nikolopoulos, S.N.**, and Turner, C.E. (2001) Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* 276: 23499–23505.

**Nitsche-Schmitz DP**, Rohde M, Chhatwal GS. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost.* 2007 Sep;98(3):488-96. Review.

## O



**O'Brien KL**, Beall B, Barrett NL, Cieslak PR, Reingold A, Farley MM, Danila R, Zell ER, Facklam R, Schwartz B, Schuchat A. Epidemiology of invasive group a streptococcus disease in the United States, 1995-1999. *Clin Infect Dis*. 2002 Aug 1;35(3):268-76. Epub 2002 Jul 10.

**O'Loughlin RE**, Roberson A, Cieslak PR, Lynfield R, Gershman K, Craig A, Albanese BA, Farley MM, Barrett NL, Spina NL, Beall B, Harrison LH, Reingold A, Van Beneden C; Active Bacterial Core Surveillance Team. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 1;45(7):853-62. Epub 2007 Aug 29.

**Okada N**, Pentland AP, Falk P, Caparon MG. M protein and protein F act as important determinants of cell-specific tropism of *Streptococcus pyogenes* in skin tissue. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):965-77.

**Olsen RJ**, Shelburne SA, Musser JM. Molecular mechanisms underlying group A streptococcal pathogenesis. *Cell Microbiol*. 2009 Jan;11(1):1-12. Epub 2008 Aug 15.

**Olsen RJ**, Musser JM. Molecular pathogenesis of necrotizing fasciitis. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:1-31. Review.

**Ozeri V**, Rosenshine I, Mosher DF, Fässler R, Hanski E. Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol Microbiol*. 1998 Nov;30(3):625-37.

**Ozeri V**, Rosenshine I, Ben-Ze'Ev A, Bokoch GM, Jou TS, Hanski E. De novo formation of focal complex-like structures in host cells by invading *Streptococci*. *Mol Microbiol*. 2001 Aug;41(3):561-73.

## P, Q

---

**Pawson T**. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):191-203.

**PeyronP**. Non opsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins, *J. Immunol*. 165 (2000) 5186–5191.

**Podbielski A**, Woischnik M, Leonard BA, Schmidt KH. Characterization of *nra*, a global negative regulator gene in group A streptococci. *Mol Microbiol*. 1999 Feb;31(4):1051-64.

## R

---

**Ramachandran V**, McArthur JD, Behm CE, Gutzeit C, Dowton M, Fagan PK, Towers R, Currie B, Sriprakash KS, Walker MJ. Two distinct genotypes of *prtF2*, encoding a fibronectin binding protein, and evolution of the gene family in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol*. 2004 Nov;186(22):7601-9.

**Rameh L.E**, Rhe, SG, Spoke, K, Kazlauskas A, Cantley LC, and Cantley LG (1998) Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase Cgamma-mediated calcium signaling. *J Biol Chem* 273: 23750–23757.

**Rieger UM**, Gugger CY, Farhadi J, Heider I, Andresen R, et al. 2007. Prognostic factors in necrotizing fasciitis and myositis: analysis of 16 consecutive cases at a single institution in Switzerland. *Ann. Plast. Surg.* 58:523–30

**Rocha CL, Fischetti VA**. Identification and characterization of a novel fibronectin-binding protein on the surface of group A streptococci. *Infect Immun.* 1999 Jun;67(6):2720-8.

---

## S

---

**Sabin FR**. 1920. Studies on the origin of blood-vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Carnegie Contrib Embryol* 272:214-262.

**Sauer, F. G.**, Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. & Hultgren, S. J. (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 65–72.

**Schrager HM**, Rheinwald JG, Wessels MR. Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J Clin Invest.* 1996 Nov 1;98(9):1954-8.

**Schrager HM**, Albertí S, Cywes C, Dougherty GJ, Wessels MR. Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A *Streptococcus* to CD44 on human keratinocytes. *J Clin Invest.* 1998 Apr 15;101(8):1708-16.

**Schwarz-Linek U**, Werner JM, Pickford AR, Gurusiddappa S, Kim JH, Pilka ES, Briggs JA, Gough TS, Höök M, Campbell ID, Potts JR. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature.* 2003 May 8;423(6936):177-81.

**Schwarz-Linek U**, Höök M, Potts JR. Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci. *Microbes Infect.* 2006 Jul;8(8):2291-8. Epub 2006 May 30. Review.

**Shin JS**, Gao Z, Abraham SN. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells, *Science* 289 (2000) 785–788.

**Shin JS**, Abraham SN. Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes Infect.* 2001 Jul;3(9):755-61. Review.

**Spurr, A.R.** (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26: 31–43.

**Steinberg BE, Grinstein S**. Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants. *J Clin Invest.* 2008 Jun;118(6):2002-11. Review.

**Stevens, D. L.**, M. H. Tanner, J. Winship, R. Swarts, K. M. Reis, P. M. Schlievert, and E. Kaplan. 1989. Reappearance of scarlet fever toxin A among streptococci in the Rocky Mountain West: severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome. *N. Engl. J. Med.* 321:1–7.

**Stollerman GH**. Rheumatogenic streptococci and autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991 Nov;61(2 Pt 1):131-42.

**Sukumaran, S.K.**, Quon, M.J., and Prasadaraao, N.V. (2002) *Escherichia coli* K1 internalization via caveolae requires caveolin-1 and protein kinase Ca interaction in human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 50716– 50724.

**Sumby P**, Zhang S, Whitney AR, Falugi F, Grandi G, et al. 2008. A chemokine-degrading extracellular protease made by group A *Streptococcus* alters pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Infect. Immun.* 76:978–85

## T

---

**Tajiri T**, Tate G, Akita H, Ohike N, Masunaga A, et al. 2008. Autopsy cases of fulminant-type bacterial infection with necrotizing fasciitis: group A (beta) hemolytic *Streptococcus pyogenes* versus *Vibrio vulnificus* infection. *Pathol. Int.* 58:196–202

**Takenawa T**, Itoh T. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Oct 31;1533(3):190-206.

**Talay SR**, Valentin-Weigand P, Jerlström PG, Timmis KN, Chhatwal GS.: Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun.* 1992 Sep;60(9):3837-44

**Talay SR**, Zock A, Rohde M, Molinari G, Oggioni M, Pozzi G, Guzman CA, Chhatwal GS.: Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2000 Dec;2(6):521-35

**Tart AH**, Walker MJ, Musser JM. 2007. New understanding of the group A *Streptococcus* pathogenesis cycle. *Trends Microbiol.* 15:318–25

**Terao Y**, Kawabata S, Kunitomo E, Murakami J, Nakagawa I, Hamada S. Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the fba gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol Microbiol.* 2001 Oct;42(1):75-86.

**Terao Y**, Kawabata S, Nakata M, Nakagawa I, Hamada S. Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from toxic shock-like syndrome patients. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47428-35. Epub 2002 Sep 30.

**The Working Group on Severe Streptococcal Infections.** 1993. Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome: rationale and consensus definition. *JAMA* 269:390–391.

**Timpson P**, Jones GE, Frame MC, Brunton VG. Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase activity. *Curr Biol.* 2001 Nov 27;11(23):1836-46.

**Turner, C.E.** (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* 2: E231–E236.

**Tyrrell GJ**, Lovgren M, Kress B, Grimsrud K. 2005. Invasive group A streptococcal disease in Alberta, Canada (2000 to 2002). *J. Clin. Microbiol.* 43:1678–83

U, V, W

---

**Uliczka F**, Kornprobst T, Eitel J, Schneider D, Dersch P. Cell invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* by invasin and YadA requires protein kinase C, phospholipase C-gamma1 and Akt kinase. *Cell Microbiol.* 2009 Dec;11(12):1782-801. Epub 2009 Aug 13.

**Wang B**, Yurecko RS, Dedhar S, Cleary PP. Integrin-linked kinase is an essential link between integrins and uptake of bacterial pathogens by epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2006 Feb;8(2):257-66.

**Wang B**, Li S, Dedhar S, Cleary PP. Paxillin phosphorylation: bifurcation point downstream of integrin-linked kinase (ILK) in streptococcal invasion. *Cell Microbiol.* 2007 Jun;9(6):1519-28. Epub 2007 Feb 9.

**Welch HC**, Coadwell WJ, Stephens LR, Hawkins PT. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett.* 2003 Jul 3;546(1):93-7. Review.

**Wong CH**, Yam AK, Tan AB, Song C. 2008. Approach to debridement in necrotizing fasciitis. *Am. J. Surg.* 196:e19–24

X, Y, Z

---

**Yoo SK**, Deng Q, Cavnar PJ, Wu YI, Hahn KM, Huttenlocher A. Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish. *Dev Cell.* 2010 Feb 16;18(2):226-36.

**Young MH**, Aronoff DM, Engleberg NC. 2005. Necrotizing fasciitis: pathogenesis and treatment. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 3:279–94

**Zinkernagel AS**, Timmer AM, Pence MA, Locke JB, Buchanan JT, Turner CE, Mishalian I, Sriskandan S, Hanski E, Nizet V. The IL-8 protease SpyCEP/ScpC of group A *Streptococcus* promotes resistance to neutrophil killing. *Cell Host Microbe.* 2008 Aug 14;4(2):170-8.

**Zhou D**, Galán J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins *Microbes Infect.* 2001 Nov-Dec;3(14-15):1293-8. Review.

## 7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gursharan Singh Chhatwal für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Medizinische Mikrobiologie anfertigen zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei PD. Dr. Manfred Rohde für die Übernahme des Referates, sowie bei Prof. Dr. Michael Steinert für die Übernahme des zweiten Referates.

Mein persönlicher Dank gilt ganz besonders Frau Dr. Susanne Talay, die mir während der letzten drei Jahre jederzeit mit ihrem Fachwissen und anregenden Gesprächen zur Seite stand und mich mit ihrer Begeisterung immer wieder motiviert hat.

Ganz besonders möchte ich auch Dr. Andreas Nerlich bedanken, an den ich mich stets in allen Belangen der Mikroskopie und der Bildbearbeitung wenden konnte und dessen Hilfe erheblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren möchte ich PD Dr. Manfred Rohde und Ina Schleicher für die Anfertigung der exzellenten elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken, sowie Dr. Marcus Fulde und Dr. René Bergmann für die Unterstützung bei den radioaktiven Bindungsversuchen.

Für eine tolle Zeit und eine gute Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen der MMIK und der INI bedanken. Ganz besonders bei Nina Janze, Dr. Silvana Reißmann, Melanie Lüttge, Angela Hitzmann, Nadine Nachtigall, Franziska Voigt, Ina Schleicher und Katja Branitzki-Heinemann für die vielen persönlichen und aufbauenden Gespräche und eine schöne Zeit – auch außerhalb des Labores.

Prof. Dr. Victor Nizet, Dr. Jason Cole, Dr. Andrew Hollands, sowie Dr. Maren von Koeckritz-Blickwede und Katja Branitzki-Heinemann danke ich für eine erlebnisreiche, wunderschöne und erfolgreiche Zeit in San Diego, CA.

Meinen Eltern bin ich sehr dankbar, dass sie mich in all den Jahren unterstützt haben wo sie konnten und immer an mich geglaubt haben, genauso wie Elma und Uwe. Ganz besonders möchte ich mich bei Giso bedanken. Für so viel, dass der Platz an dieser Stelle nicht reicht.